

BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS
AROMÁTICOS POLICÍCLICOS (HAP) Y ELEMENTOS TRAZAS METÁLICOS (ETM)
CON AYUDA DE *MISCANTHUS X GIGANTEUS* (MxG)
Y UNA ASOCIACIÓN DE BACTERIAS

CLAUDIA PATRICIA MARTÍNEZ CHOIS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE OCCIDENTE
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS AMBIENTALES
PROGRAMA ADMINISTRACIÓN DEL MEDIO AMBIENTE
Y DE LOS RECURSOS NATURALES
SANTIAGO DE CALI
2007

BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS
AROMÁTICOS POLICÍCLICOS (HAP) Y ELEMENTOS TRAZAS METÁLICOS (ETM)
CON AYUDA DE *MISCANTHUS X GIGANTEUS* (MxG)
Y UNA ASOCIACIÓN DE BACTERIAS

CLAUDIA PATRICIA MARTÍNEZ CHOIS

Pasantía para optar al título de Administradora del Medio Ambiente y de los
Recursos Naturales

Director
Prof. HDR. JAIRO FALLA
Director de Investigaciones I.U.T. Thionville/Yutz
Universidad Paul Verlaine (Francia)

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE OCCIDENTE
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS AMBIENTALES
PROGRAMA ADMINISTRACIÓN DEL MEDIO AMBIENTE
Y DE LOS RECURSOS NATURALES
SANTIAGO DE CALI
2007

Nota de aceptación:

Aprobado por el Comité de Grado en cumplimiento de los requisitos exigidos por la Universidad Autónoma de Occidente para optar al título de Administrador del Medio Ambiente y de los Recursos Naturales

Químico. ALEJANDRO SOTO
Jurado

Bióloga. ELIZABETH MUÑOZ
Jurado

Santiago de Cali, Febrero 15 de 2007

Quisiera dedicar este trabajo a mi familia, que me ha acompañado incondicionalmente en el transcurso de mi vida y me ha apoyado en la realización de mis logros, cultivando siempre mis valores y viéndome crecer como persona y futura profesional. Su paciencia y sus excelentes consejos me permitieron soñar y apreciar las oportunidades que se me han presentado para seguir con arraigo mis pasiones y aspiraciones. Les debo la alegría. Los quiero mucho.

A mis profesores y compañeros quienes me abrieron las puertas del universo imaginable de la trama de la vida.

AGRADECIMIENTOS

Tiendo a agradecer,

Al profesor Jairo FALLA por acogerme en su grupo de investigación, brindándome la oportunidad de enriquecer mi formación académica y permitiéndome conocer y disfrutar nuevas culturas. Su acompañamiento durante los 6 meses de trabajo dedicado, me inspiró a continuar con mis estudios en investigación.

A la Universidad Autónoma de Occidente por participar activamente en mi formación como profesional, y confiar en mis capacidades y aptitudes para llevar a cabo una experiencia semejante.

Al grupo de Investigación y personal del laboratorio por recibirme como compañera y amiga; su paciencia y colaboración me ayudaron a finalizar con éxito mi estadía en el instituto.

CONTENIDO

| | Pág. |
|--|------|
| RESUMEN | 15 |
| ABSTRACT | 16 |
| INTRODUCCIÓN | 16 |
| 1. PREFACIO | 17 |
| 2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA | 20 |
| 3. JUSTIFICACIÓN | 23 |
| 4. OBJETIVOS | 25 |
| 4.1 OBJETIVO GENERAL | 25 |
| 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 25 |
| 5. MARCO TEÓRICO | 26 |
| 5.1 CONCERNIENTE A LA BIORREMEDIACIÓN | 26 |
| 5.2 LA BIORREMEDIACION DE SUELOS | 28 |
| 5.2.1 Biorremediación In Situ de los suelos | 29 |
| 5.2.2 Biorremediación Ex Situ de suelos | 30 |
| 5.3 LOS HIDROCARBUROS | 31 |
| 5.4 LOS HIDROCARBUROS AROMATICOS POLICICLICOS (HAP) | 32 |
| 5.4.1 Características generales de los HAP | 32 |
| 5.4.2 Propiedades físico-químicas de los HAP | 33 |
| 5.4.3 Genotoxicidad y toxicidad de los HAP | 36 |
| 5.4.4 HAP en el medio ambiente | 40 |
| 5.5 BIORREMEDIACION DE LOS HAP EN EL SUELO | 44 |
| 5.5.1 Biodegradación bacteriana de los HAP en el suelo | 44 |
| 5.5.2 Fitorremediación de los HAP en el suelo | 46 |
| 5.5.3 Marco legal de los HAP | 49 |
| 5.6 LOS ELEMENTOS TRAZAS METALICOS (ETM) | 50 |
| 5.6.1 Características generales de los ETM | 50 |

| | |
|---|-----|
| 5.6.2 Deficiencia y toxicidad de los ETM | 52 |
| 5.6.3 Biorremediación de los suelos contaminados con ETM | 54 |
| 5.6.4 Marco legal de los ETM | 55 |
| 5.7 <i>Miscanthus x giganteus</i> (MxG) | 56 |
| 5.7.1 Orígenes y características generales de MxG | 56 |
| 5.7.2 Utilización de MxG | 58 |
| 5.7.3 Importancia de MxG para la biorremediación de suelos | 59 |
| 6. DISEÑO METODOLÓGICO | 61 |
| 6.1 METODOLOGIA DE LA INVESTIGACION | 61 |
| 6.2 MATERIALES Y METODOS | 61 |
| 6.2.1 Material bacteriológico | 61 |
| 6.2.2 Material vegetal: <i>Miscanthus x giganteus</i> | 62 |
| 6.2.3 Suelos Standard estériles | 63 |
| 6.2.4 Suelos del Carreau Wendel – Vuillemin | 64 |
| 6.2.5 Contaminantes | 88 |
| 6.2.6 Diseño experimental | 90 |
| 7. RESULTADOS y ANÁLISIS | 101 |
| 7.1 ANÁLISIS DEI SUELO DE LA MINA CARREAU WENDEL | 101 |
| 7.1.1 Separación inicial del suelo de la mina Carreau Wendel | 101 |
| 7.1.2 pH del suelo de la Mina Carreau Wendel | 101 |
| 7.1.3 Contenido en agua y materia seca del suelo de la mina Carreau Wendel | 102 |
| 7.1.4 Contenido de nitrógeno total del suelo de la mina Carreau Wendel | 103 |
| 7.1.5 Contenido en materia orgánica del suelo de la mina Carreau Wendel | 104 |
| 7.1.6 Composición granulométrica del suelo le la mina Carreau Wendel | 105 |
| 7.1.7 Elementos trazas metálicos contenidos en el suelo de la mina Carreau Wendel | 107 |
| 7.1.8 Capacidad de intercambio catiónico del suelo de la mina Carreau Wendel | 109 |
| 7.2 Resultados de los experimentos realizados sobre el suelo Standard | 111 |
| 7.2.1 Análisis del desarrollo de <i>Miscanthus x giganteus</i> | 111 |
| 7.2.2 Análisis físico-químico y biológico de los recipientes | 121 |

| | |
|--|-----|
| 7.3 Resultados de los experimentos realizados sobre el suelo de la mina Carreau Wendel | 133 |
| 7.3.1 Análisis del desarrollo de <i>Miscanthus x giganteus</i> | 133 |
| 7.3.2 Análisis físico-químico y biológico de los recipientes | 137 |
| 8. CONCLUSIONES | 138 |
| 9. RECOMENDACIONES | 145 |
| BIBLIOGRAFÍA | 147 |
| ANEXOS | 158 |

LISTA DE TABLAS

| | Pág. |
|--|------|
| Tabla 1. Ventajas y desventajas de la biorremediación | 28 |
| Tabla 2. Propiedades físico-químicas de los HAP | 37 |
| Tabla 3. Carácter cancerígeno y mutagénico de los HAP según el IARC (1986) | 38 |
| Tabla 4. Tiempos de vida media de los HAP en el suelo | 43 |
| Tabla 5. Bacterias específicas de la degradación de HAP | 45 |
| Tabla 6. Límites permisibles para HAP's establecido por Canadá y los Países Bajos y Criterios de limpieza desarrollados por la PROFEPA | 49 |
| Tabla 7. Límites máximos permisibles para aguas de consumo humano y uso doméstico | 50 |
| Tabla 8. Criterios de calidad con respecto al contenido de metales pesados del suelo ($\mu\text{g.g}^{-1}$ suelo) | 56 |
| Tabla 9. Valores límites permisibles de metal en el suelo de uso agrícola para la aplicación de lodos industriales | 89 |
| Tabla 10. Plano experimental sobre SUELO STANDARD (verano 2006) | 91 |
| Tabla 11. Distribución del plano experimental - SUELO STANDARD | 92 |
| Tabla 12. Plano experimental sobre SUELO DE MINA (verano 2006) | 93 |
| Tabla 13. Distribución del plano experimental – SUELO DE MINA | 94 |
| Tabla 14. Separación inicial del suelo de la mina Carreau Wendel | 101 |
| Tabla 15. pH del suelo de la Mina Carreau Wendel | 102 |
| Tabla 16. Contenido en agua y materia seca del suelo de la mina Carreau Wendel | 102 |
| Tabla 17. Contenido de Nitrógeno del suelo de la mina Carreau Wendel | 103 |
| Tabla 18. Contenido de carbono orgánico del suelo de la mina Carreau Wendel | 104 |
| Tabla 19. Granulometría general del suelo de la mina Carreau Wendel | 106 |
| Tabla 20. Granulometría detallada del suelo de la mina Carreau Wendel | 106 |
| Tabla 21. Contenido en elementos trazas metálicos del suelo de la mina Carreau Wendel | 107 |

| | |
|--|-----|
| Tabla 22. Contenido aparente de elementos trazas metálicos en el suelo de la mina Carreau Wendel en relación a algunas normas existentes | 109 |
| Tabla 23. Análisis del acetato de amonio percolado en el suelo de la mina Carreau Wendel | 109 |
| Tabla 24. Análisis por titulación con nitrógeno amoniacal | 110 |
| Tabla 25. Observaciones de la brotación de <i>Miscanthus x giganteus</i> | 112 |
| Tabla 26. Biomasa de <i>MxG</i> sin tratamiento | 122 |
| Tabla 27. Biomasa de <i>MxG</i> con tratamiento HAP | 125 |
| Tabla 28. Biomasa de <i>MxG</i> con tratamiento HAP - ETM | 127 |
| Tabla 29. Biomasa de <i>MxG</i> con tratamiento ETM | 130 |
| Tabla 30. Observaciones de la brotación de <i>Miscanthus x giganteus</i> | 134 |

LISTA DE FIGURAS

| | Pág. |
|---|------|
| Figura 1. Ubicación geográfica del I.U.T. de Thionville/Yutz | 17 |
| Figura 2. Organigrama general del IUT de Thionville/Yutz | 18 |
| Figura 3. Estructura molecular de los 16 HAP prioritarios propuestos por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos – EPA | 34 |
| Figura 4. Modelo de la disponibilidad de los ETM en el suelo | 52 |
| Figura 5. Ubicación geográfica de la mina de carbón Carreau Wendel-Vuillemin | 64 |
| Figura 6. Procedimiento e instrumentos para la separación inicial de suelos | 68 |
| Figura 7. Porcentaje de brotación de <i>MxG</i> - Suelo Standard | 113 |
| Figura 8. Evolución del crecimiento de <i>MxG</i> sin tratamiento | 115 |
| Figura 9. Altura promedio de <i>MxG</i> sin tratamiento | 115 |
| Figura 10. Evolución del crecimiento de <i>MxG</i> con tratamiento HAP | 116 |
| Figura 11. Altura promedio de <i>MxG</i> con tratamiento HAP | 117 |
| Figura 12. Evolución del crecimiento de <i>MxG</i> con tratamiento HAP-ETM | 118 |
| Figura 13. Altura promedio de <i>MxG</i> con tratamiento HAP-ETM | 119 |
| Figura 14. Evolución del crecimiento de <i>MxG</i> con tratamiento ETM | 120 |
| Figura 15. Altura promedio de <i>MxG</i> con tratamiento ETM | 120 |
| Figura 16. Biomasa por modalidad de <i>MxG</i> sin tratamiento | 123 |
| Figura 17. Relación parte aérea - raíz de <i>MxG</i> sin tratamiento | 124 |
| Figura 18. Biomasa <i>MxG</i> con tratamiento HAP | 126 |
| Figura 19. Relación parte aérea - raíz de <i>MxG</i> con tratamiento HAP | 126 |
| Figura 20. Biomasa <i>MxG</i> con tratamiento HAP-ETM | 128 |
| Figura 21. Relación parte aérea - raíz de <i>MxG</i> con tratamiento HAP-ETM | 129 |
| Figura 22. Biomasa de <i>MxG</i> con tratamiento ETM | 130 |
| Figura 23. Relación parte aérea - raíz de <i>MxG</i> con tratamiento ETM | 132 |
| Figura 24. Biomasa total (PA + R) promedio de <i>MxG</i> por tratamiento | 132 |
| Figura 25. Relación parte aérea-raíz promedio de <i>MxG</i> para cada tratamiento | 133 |

| | |
|---|-----|
| Figura 26. Evolución del crecimiento de <i>MxG</i> en suelo de la mina Carreau Wendel | 135 |
| Figura 27. Altura promedio de <i>MxG</i> en suelo de la mina Carreau Wendel | 136 |

LISTA DE FOTOGRAFÍAS

| | Pág. |
|---|------|
| Fotografía 1. Instituto Tecnológico Universitario de Thionville/Yutz (Francia) | 17 |
| Fotografía 2. Prototipo ideal de brote de <i>MxG</i> para los experimentos | 63 |
| Fotografía 3. Vegetación y vestigios del Carreau Wendel | 65 |
| Fotografía 4. Secado del suelo del Carreau Wendel | 66 |
| Fotografía 5. Instrumentos de mineralización y destilación para en análisis del nitrógeno total | 71 |
| Fotografía 6. Calcinación de las muestras (horno NABERTHERM) | 75 |
| Fotografía 7. Análisis granulométrico por sedimentación | 78 |
| Fotografía 8. Espectrofotómetro de absorción atómica SPECTRAA 55 | 81 |
| Fotografía 9. Instalación de los experimentos | 95 |
| Fotografía 10. Clasificación de las repeticiones de acuerdo a su modalidad | 98 |
| Fotografía 11. Ejemplo de extracción de <i>Miscanthus x giganteus</i> | 99 |

LISTA DE ANEXOS

| | Pág. |
|--|------|
| Anexo A. Certificados del IUT Thionville/Yutz, Universidad Paul Verlaine (Metz, Francia) | 158 |
| Anexo B. Caracterización del suelo Standard No. A3 | 160 |
| Anexo C. Descripción de la antigua mina de carbón Carreau Wendel | 161 |
| Anexo D. Detalle de los resultados obtenidos para los análisis de suelo de la mina Carreau Wendel | 162 |
| Anexo E. Registros de la evolución del crecimiento de <i>Miscanthus x giganteus</i> –Suelo Standard | 171 |
| Anexo F. Biomasa de <i>Miscanthus x giganteus</i> – suelo Standard | 175 |
| Anexo G. Registros de la evolución del crecimiento de <i>Miscanthus x giganteus</i> –Suelo de la mina Carreau Wendel | 179 |

RESUMEN

El documento a continuación concerniente a la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) y Elementos trazas metálicos (ETM) a través de la utilización de *Miscanthus x giganteus* (MxG, gramínea con fotosíntesis de tipo C4) en asociación a comunidades bacterianas especializadas en la degradación del pireno o resistentes al mismo, permitieron analizar el desarrollo de los brotes de MxG, la evolución de su crecimiento y la biomasa producida de acuerdo al contenido en contaminantes, material microbiológico y características físico-químicas de suelos Standard (estériles y de características específicas conocidas) y los suelos provenientes de la antigua mina de carbón Carreau Wendel. Los resultados obtenidos para el suelo Standard permitieron poner en evidencia una relación aparentemente positiva entre la planta y las comunidades bacterianas presentes en los suelos. Igualmente se observa que en presencia de HAP aparentemente existe una mayor producción de biomasa total y del sistema radicular de *Miscanthus x giganteus*. En el caso del suelo de la mina, el desarrollo de la planta se vio drásticamente afectado, lo cual podría atribuirse a las condiciones del suelo; sin embargo, se resalta que aparentemente el desarrollo de MxG en presencia de bacterias presentó mejores resultados para el porcentaje de brotación (es decir, observación del brote en la superficie del suelo) y la altura promedio final de las plantas.

Palabras claves: biorremediación, *Miscanthus x giganteus*, hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), elementos trazas metálicos (ETM), suelos, Universidad Paul Verlaine, Universidad Autónoma de Occidente.

ABSTRACT

This document concern the bioremediation of soils contaminated with policíclicos aromatic hydrocarbons (PAH) and trace metallic elements (TME) through the use of *Miscanthus x giganteus* (MxG, gramineae with C4 type photosynthesis) in association to bacterial communities specialized in pyrene degradation or resistant to it , allowed to analyze the development of the buds of MxG, the evolution of its growth and the biomass produced according to the content in polluting agents, microbiological material and physical-chemistries characteristics of Standard soils (sterile soils with specific characteristics known) and soils of the closed mine Carreau Wendel. The results obtained for the Standard soils experiment allowed to put in evidence an apparently positive relation between the plant and bacterial communities. Also it is observed that in the presence of HAP apparently it exist a better production of total biomass and development of roots system of *Miscanthus x giganteus*. In the case of mine's soils experiment, the development of the plant was drastically affected, which could be attributed to soil characteristics; nevertheless, it is emphasized that apparently the development of MxG in the presence of bacteria had better results for the percentage of success in buds outside surface and the final height average.

Key Words: bioremediación, *Miscanthus x giganteus*, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH), trace metallic elements (TME), soils, Paul Verlaine University, Autónoma de Occidente University.

INTRODUCCIÓN

Con el fin de cumplir los requisitos para optar por el título profesional de Administradora del Medio Ambiente y de los Recursos Naturales, la estudiante Claudia Patricia Martínez Chois realizó su opción de grado en la modalidad de pasantía. Dicha pasantía se encuentra inmersa en el marco de investigación científica a nivel internacional, y se desarrolló en la Universidad Paul Verlaine de Metz (Francia), involucrándose con el equipo de Inmunología-microbiología ESE-UMR 7146, dirigido por el Prof. HDR. Jairo Falla, del Instituto Tecnológico Universitario de Thionville/Yutz. (Anexo A)

La estudiante realizó un acompañamiento en el estudio concerniente a la biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) a través de la biodegradación bacteriana en asocio con la fitorremediación con *Miscanthus x giganteus* (MxG), permitiéndole así afianzar sus conocimientos en este campo, además de conocer los métodos científicos utilizados en el mismo.

Durante un periodo de seis meses, la estudiante participó en un proyecto prospectivo para poner en evidencia los efectos de *Miscanthus x giganteus* y una asociación de bacterias en la recuperación de suelos contaminados; para ello, dos tipos de suelo fueron utilizados: suelo Standard y los provenientes de una antigua mina de carbón cuyas características se desconocían.

Así pues, la primera parte del trabajo correspondió al análisis preliminar de los suelos proveniente de la mina, por medio del cual la estudiante se familiarizó con las diferentes metodologías francesas utilizadas para conocer la calidad de los suelos. La segunda parte, concierne la preparación, puesta en marcha y seguimiento de los dos planos experimentales (uno para cada tipo de suelo). Es de resaltar que el suelo Standard fue contaminado artificialmente, y se procuró en lo posible controlar todas las variables experimentales en laboratorio.

Se espera que con la ejecución de este trabajo se facilite a otros estudiantes y docentes del programa de Administración del Medio Ambiente y de los Recursos Naturales, la oportunidad de llevar a cabo una experiencia similar en un futuro, y por tanto obtener un reconocimiento de la universidad a nivel global.

1. PREFACIO

La investigación se llevó a cabo en los laboratorios del Instituto Tecnológico Universitario (I.U.T.) de Thionville/Yutz (Fotografía 1), el cual hace parte de la Universidad Paul Verlaine de Metz (Lorraine, Francia).

Fotografía 1. Instituto Tecnológico Universitario de Thionville/Yutz (Francia)



Este Instituto se encuentra ubicado en el departamento de la Moselle, uno de los 4 departamentos que conforman la región de la Lorraine (Francia), específicamente en la localidad de Yutz, aproximadamente 30 km al norte de la ciudad de Metz (Figura 1).

Figura 1. Ubicación geográfica del I.U.T. de Thionville/Yutz



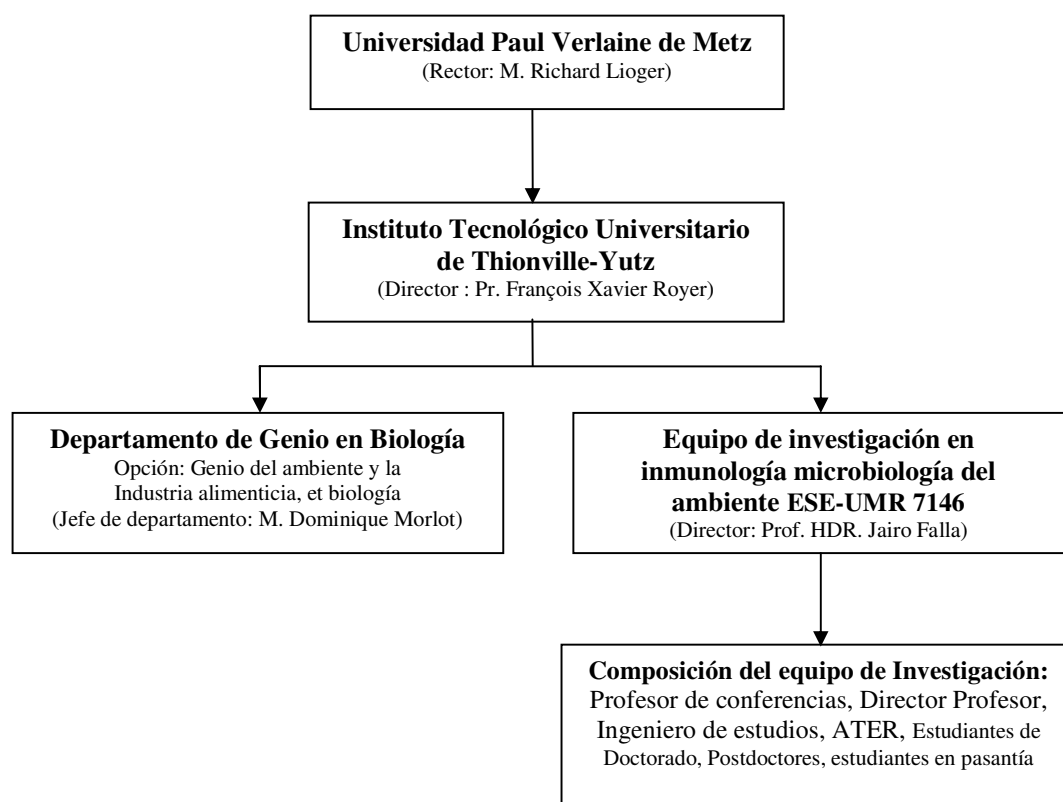
Modificado por el autor

Fuente: UNION REGIONALE DES CONSEILS D'ARCHITECTURE D'URBANISME ET DE L'ENVIRONNEMENT DE LORRAINE. Carte de Lorraine, France [en línea]. Metz : Departement de la Moselle, 2006. [consultado 25 de Noviembre de 2006]. Disponible en Internet: www.urcaue-lorraine.com/img/illu/carteFrAcc.jpg.

INSTITUT UNIVERSITAIRE DE TECHNOLOGIE THONVILLE YUTZ (I.U.T.). Situation-adresse. Yutz: 2006. [consultado 25 Noviembre de 2006]. Disponible en Internet: http://www.iut.univ-metz.fr/article.php3?id_article=148

Este instituto acoge estudiantes que están interesados en continuar sus estudios para obtener un diploma universitario de tecnología (BAC + 2), licencia profesional (BAC + 3) o estudiantes de doctorado. El organigrama se presenta en la figura 2.

Figura 2. Organigrama general del IUT de Thionville/Yutz



El equipo de investigación de inmunología-microbiología ESE-UMR 7146 es dirigido por el Profesor Jairo Falla, quien a su vez es el director y orientador de esta pasantía; el equipo se encuentra compuesto por: 1 profesor, 2 profesores de conferencia, 1 ingeniero de estudios, 2 ATER (Agregados Temporales de Enseñanza e Investigación), 1 estudiante de doctorado y 1 postdoctor. Los estudiantes en pasantía son temporales y su número varía para cada periodo escolar.

Las diferentes actividades desarrolladas por el equipo conciernen¹:

- La biovigilancia de la calidad del aire. Un prototipo de biocaptor de contaminación atmosférica fue creado por el equipo de investigación. Su principio general consiste en comparar la movilidad de los macrófagos (THP-1) en el aire ambiente y un medio no contaminado, a través del análisis de imágenes. Esto permite controlar de manera global el aire y de poner en relación el impacto de los contaminantes sobre la salud (humana y de los ecosistemas).
- La biovigilancia de la calidad del agua. Las investigaciones sobre este tema han conducido a la creación de un bioindicador de contaminación para nuevos contaminantes, particularmente para los estrógenos miméticos. Un método de dosificación fue desarrollado para el equipo, con el fin de establecer la relación entre las dosis de una proteína específica (los “vitellogénines”) y los niveles de contaminación.
- La biovigilancia de la calidad de los suelos. Dos estudios se desarrollan actualmente concernientes a la contaminación de los suelos: la descontaminación de suelos afectados por metales a través de la utilización de una bacteria (*Cupriavidus metallidurans CH34*); la descontaminación de los suelos afectados por hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) con *Miscanthus x giganteus* y una asociación de bacterias (siendo este último, el proyecto en el cual estuvo involucrada la estudiante para realizar su trabajo de pasantía por un periodo de 6 meses).

¹ ENTREVISTA con Jairo Falla, Director grupo de Investigaciones I.U.T. de Thioville/Yutz. Yutz, 02 de Mayo de 2006.

2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

El suelo es uno de los principales receptores de desechos derivados de la actividad humana. Su proximidad y participación indispensable en el desarrollo de los diferentes sistemas agrícolas, explotación minera, doméstica, o debido a los impactos generados por diferentes eventos indirectos como escapes y fugas de sustancias tóxicas, convierten a los suelos en un compartimiento del ambiente fuertemente vulnerable a la contaminación.

Esta fragilidad depende de varios factores como las características de los contaminantes, el grado de afectación provocado en el sistema y la capacidad intrínseca del suelo para degradar los productos naturales y antrópicos gracias a sus propiedades físico-químicas² y los ciclos biogeoquímicos presentes en la naturaleza³.

Sin embargo, en muchas ocasiones los niveles de resiliencia para la remediación natural de los suelos son muy bajos en comparación al impacto de las cargas contaminantes recibidas, por lo que es necesario una intervención del hombre para facilitar o propiciar condiciones necesarias que permitan la recuperación de las zonas afectadas⁴.

El desarrollo de la industria ha traído consigo la extracción de combustibles fósiles, que al ser transformados incompletamente por combustión para ser utilizados como principal fuente de energía, genera un gran número de derivados que en la mayoría de los casos son nocivos para el ambiente. Este es el caso de los hidrocarburos aromáticos policíclicos, también conocidos como HAP o PAH, los cuales se producen en la combustión incompleta de compuestos orgánicos y pueden persistir en el medio ambiente sin alterar sus propiedades tóxicas⁵.

² DOMÉNECH, X. Química Ambiental: el impacto ambiental de los residuos. Edición n°2. Madrid: Miraguano ediciones, 1994. p.15. ISBN 84-7813-109-4.

³ LOVELOCK, J.. Gaia: una ciencia para curar el planeta. Barcelona: Ed. Oasis, 1992. p. 192.

⁴ EWEIS J.B. ET AL. Principios de biorrecuperación: tratamientos para la descontaminación y regeneración de suelos y aguas subterráneas mediante procesos biológicos y físico-químicos. Madrid: McGRAW-HILL, 1999. p. 7. ISBN: 84-481-2511-8.

⁵ GREENPEACE INTERNACIONAL. Hidrocarburos aromáticos policíclicos [en línea]. Amsterdam: Greenpeace International, 2006. [consultado 10 de Febrero de 2006]. Disponible en Internet: <http://archivo.greenpeace.org/informes/Hidrocarburos.pdf>

Según el Ministère General de Coopération Économique et Développement⁶, dichos componentes pueden quedar retenidos en los organismos vivos, resultando ser cancerígenos y en ciertas ocasiones mutagénicos en animales; el hombre no se encuentra exento de esta situación.

Los elementos trazas metálicos (ETM) también se consideran contaminantes potenciales para el suelo dependiendo de las concentraciones o deficiencias, y según el uso destinado para dicho compartimiento. Estos efectos se evidencian principalmente en la agricultura, conllevando a graves efectos sobre la salud humana, como fue el caso de la “enfermedad de Itai – Itai”⁷ (años 50) por la hiperacumulación de cadmio en los vegetales.

Hoy en día los estudios han demostrado que de acuerdo a las características de los contaminantes estos pueden ser degradados, y por ende eliminados de los sustratos sólidos, líquidos o gaseosos donde se encuentren, utilizando microorganismos como lo son bacterias, hongos, y algunas especies vegetales. A esta práctica se le denomina biorremediación⁸ o biorrecuperación⁹.

Sin embargo, debido a las características de los contaminantes y las facultades de los organismos para llevar a cabo la remediación pertinente, es necesario desarrollar estudios que permitan determinar el éxito en el proceso. Es de mencionar que la combinación de diferentes organismos vivos puede incrementar la eficiencia y eficacia de los mecanismos de descontaminación.

Dentro del contexto general del problema de investigación surgen entonces las siguientes preguntas:

⁶ MINISTÈRE GENERAL DE COOPÉRATION ÉCONOMIQUE ET DÉVELOPEMENT (BMZ). Manuel sur l'environnement Volume III: Catalogue des normes antipollution. Alemania: GTZ, 1996. p. 397. ISBN: 3-528-02316-3.

⁷ TARRADELLAS, J., ET AL. Soil ecotoxicology. United States of America: Lewis Publishers (CRC Press), 1997. p. 176. ISBN: 1-56670-134-1.

⁸ BOUCHEZ M., et al. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques dans l'environnement. Dégradation par voie microbienne. En: Revue de l'institut français du pétrole. Vol 51, No. 6 (1996); p. 797-828.

⁹ EWEIS, Op. cit., p. 13

¿Cómo biorremediar los suelos de la mina Carreau Wendel y suelos Standares contaminados con HAP y ETM a través de la fitorremediación con *Miscanthus x giganteus* en asocio a una biodegradación bacteriana?

¿Existe acaso una relacion positiva entre *Miscanthus x giganteus* y la asociación de bacterias utilizadas?

3. JUSTIFICACIÓN

Los impactos generados por el desarrollo de diversas actividades industriales, agrícolas, mineras en las diferentes sociedades han dejado deshabilitadas grandes extensiones de tierra.

Según la norma francesa NF ISO 11074 - 1 de 1997¹⁰, se definen como sitios contaminados los lugares donde se detecta por lo menos una sustancia en concentraciones peligrosas; este es el caso de las instalaciones industriales abandonadas.

En efecto la región de Lorraine (Francia) ha sido fuertemente afectada por la actividad industrial y minera, siendo altamente utilizada para la producción de carbón y acero; lo anterior a dejado extensiones de terreno abandonados después de varios años de explotación.¹¹

Sin embargo, ante esta situación se ha despertado el interés de diferentes gobiernos para desarrollar proyectos que permitan rehabilitar dichos suelos contaminados.

Es de mencionar que hoy en día los estudios demuestran la capacidad de ciertos organismos de reducir los contaminantes específicos presentes en el suelo, fenómeno conocido como Biorremediación. Se considera que las bacterias y los hongos juegan un rol muy importante en la degradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos; las bacterias utilizan los HAP, de dos a cuatro ciclos, como sustrato de crecimiento provocando la mineralización de dichos contaminantes. Las plantas por su parte intervienen activamente la extracción de compuestos metálicos a través de su bioacumulación en los tejidos.

Por lo tanto, al emplear sistemas de remediación biológica en zonas consideradas como no aptas para ningún tipo de actividad debido a su condición, se podría

¹⁰ ASSOCIATION FRANÇAISE DE NORMALISATION (AFNOR). Qualité du sol – Vocabulaire – Partie 1 : Termes et définitions relatifs à la protection et à la pollution des sols. Norme NF ISO 11074-1, 1997. p. 23.

¹¹ ENTREVISTA con Jairo Falla, Director grupo de Investigaciones I.U.T. de Thioville/Yutz. Yutz, 02 de Mayo de 2006.

retornar la vocación al suelo, dándole un uso alternativo y, de manera simultanea, propiciando su restauración con procesos naturales.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Participar en las actividades de investigación desarrolladas por el equipo de Inmunología-Microbiología ESE-UMR 7146 en la I.U.T. de Thionville/yutz dirigido por el Prof. HDR. Jairo Falla (Université Paul Verlaine – Metz, Francia), en el estudio prospectivo para poner en evidencia la degradación de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) y algunos metales (ETM) presentes en el suelo, a través de procesos de Biorremediación bacteriana y fitorremediación con *Miscanthus x giganteus* (MxG)

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

4.2.1 Realizar el análisis físico-químico de los suelos provenientes de la mina Carreau Wendel (Forbach, Francia) aplicando las Normas Técnicas Francesas.

4.2.2 Poner en marcha dos experimentos, sobre el suelo de la mina y un suelo Standard (estéril) respectivamente, para estudiar la degradación de los HAP y ETM con ayuda de *Miscanthus x giganteus* y una asociación de bacterias.

4.2.3 Estudiar el desarrollo en el tiempo de los experimentos a través del análisis del porcentaje de brotación de MxG, el crecimiento de las plantas y el estudio de la biomasa producida.

5. MARCO TEÓRICO

5.1 CONCERNIENTE A LA BIORREMEDIACIÓN

La biorremediación hace referencia a los diferentes sistemas utilizados para eliminar completamente, o por partes, los contaminantes minerales y orgánicos presentes en los compartimentos del ambiente (aire, agua y suelo); en muchas ocasiones dichos compuestos son de origen antrópico y provienen de actividades industriales, agrícolas y domésticas. Diversos autores como Eweis et al.¹², Bouchez et al.¹³, Spriggs et al.¹⁴ y Doménech¹⁵ coinciden en que estos sistemas tienen la particularidad de integrar microorganismos (hongos y bacterias principalmente) y plantas (fitorremediación) capaces de absorber o de transformar los contaminantes en productos menos nocivos y aceptables para el medio ambiente.

Dichos sistemas de descontaminación existen normalmente en la naturaleza, pero se encuentran limitados por las condiciones físicas, químicas y medioambientales, que se traducen en un aumento del tiempo de degradación o la reducción del rendimiento de descontaminación en los diversos medios. En consecuencia, a través de los procesos de biorremediación, el ser humano intenta modificar estas restricciones modificando los factores anteriormente descritos (bioestimulación) o introduciendo nuevos organismos bajo condiciones controladas (bioaumentación) para promover o acelerar la degradación de los contaminantes.¹⁶

Existen dos categorías de tratamiento:

¹² EWEIS, Op. cit., p. 5

¹³ BOUCHEZ, Op. cit., p. 797-828

¹⁴ SPRIGGS, Thomas; BANKS, M. Catherine y SCHWAB, Paul. Phytoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons in manufactured gas plant-impacted soil [en línea]. Journal of Environmental Quality: Madison, Sep/Oct 2005. Vol. 34, Iss.5. p. 1755. [consultado 1 abril, 2006]. Disponible en Internet:

<http://proquest.umi.com/pqdweb?did=909235931&sid=6&Fmt=3&clientId=53958&RQT=309&VName=PQD>

¹⁵ DOMÉNECH, Op. cit., p. 27

¹⁶ ENVIRONMENTAL REMEDIATION SCIENCES. General information: Glossary [en línea]. United Status, 2006. [consultado 07 de Septiembre de 2006]. Disponible en Internet:

<http://www.lbl.gov/ERSP/generalinfo/glossary.html>

- Biorremediación *In situ* consiste en utilizar el potencial de degradación de los microorganismos presentes en un medio determinado, generalmente en el suelo y las aguas subterráneas contaminadas, para sanearlo. A menudo, en estos procesos se introducen elementos que permiten el desarrollo de microorganismos, que conlleva a la degradación de los compuestos indeseados; este tipo de degradación corresponde a las actividades realizadas “directamente sobre el terreno”¹⁷.

- Biorremediación *Ex situ* se lleva a cabo fuera del lugar donde se encuentran los contaminantes, es decir que exige la “extracción del sustrato contaminado antes de ser manipulado”¹⁸ (en la mayoría de los casos se excavan los terrenos y se tratan en emplazamientos en los que se pueda controlar la infiltración del agua).

Por otro lado, la Federal Remediation Technologies Roundtable¹⁹ considera que la biorremediación puede llevarse a cabo bajo dos condiciones diferentes:

- Condiciones aeróbicas. La degradación de los contaminantes se realiza en presencia de oxígeno y otros elementos nutritivos; aquí los microorganismos transforman los contaminantes orgánicos en dióxido de carbono, agua y masa microbiana. Pese a dichas ventajas, a bajas temperaturas la remediación aeróbica disminuye sus rendimientos.

- Condiciones anaeróbicas. Contrariamente a la aeróbica, la degradación de los contaminantes tiene lugar en ausencia de oxígeno. Los compuestos orgánicos son transformados en metano, cantidades limitadas de dióxido de carbono y trazas de hidrógeno.

¹⁷ ECOFOX. Bioremédiation In Situ [en línea]. Belgique: 21 de Feb, 2006. [consultado 04 de Septiembre de 2006]. Disponible en Internet :

<http://www.ecofox.com/bioremediation.html>

¹⁸ BRUXELLES ENVIRONNEMENT. Assainissement ex-situ « off site » [en línea]. Belgique, Bruxelles : 15 de Marzo, 2006. [consultado 07 de Septiembre de 2006]. Disponible en Internet:

<http://www.ibgebim.be/francais/contenu/content.asp?ref=1168>

¹⁹ FEDERAL REMEDIATION TECHNOLOGIES ROUNDTABLE. Remediation technologies screening matrix and reference guide. 4th edition [en línea]. Etats Unit, Virginia: Janvier, 2002. [consultado 11 de Septiembre de 2006]. Disponible sur Internet :

<http://www.frtr.gov/matrix2/section4/4-2.html>

Aunque tradicionalmente se han empleado diversos tratamientos físicos y químicos para la descomposición de los contaminantes, al utilizar procesos biológicos se obtienen ventajas y desventajas con respecto a los anteriores (ver Tabla 1).

Tabla 1. Ventajas y desventajas de la biorremediación

| Ventajas | Desventajas |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> - Disminución de costos - Degradación y eliminación de contaminantes tóxicos y no traslado del contaminante a un medio o ubicación diferente - Es una tecnología sencilla | <ul style="list-style-type: none"> - Dificultad en predecir su comportamiento y extrapolación a escalas de ensayos, de laboratorio a plantas piloto - Depende de las destrezas de los operadores para mantener las condiciones ambientales necesarias para el crecimiento de los microorganismos - Demanda de tiempo |

Es de Resaltar que desafortunadamente en algunas ocasiones los productos de la degradación (“metabolitos más polares”²⁰), pueden ser más peligrosos que el contaminante original.

5.2 LA BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS

Aunque el suelo tiene la capacidad de autodepurarse, gracias a la existencia de ciertos componentes que pueden retener o transformar los contaminantes, se han desarrollado metodologías de tratamiento que permiten optimizar dichos procesos.

Existen dos tipos de tratamiento para la biorrecuperación de los suelos: el tratamiento *In Situ* y *Ex Situ*; estos suelen consistir en una combinación de procesos y actividades biológicas y no biológicas.

²⁰ BOUCHEZ, Op. cit., p. 797-828

5.2.1 Biorremediación *In Situ* de los suelos. Según la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos²¹ la biorremediación *In Situ* de suelos es un procedimiento que presenta varias ventajas: bajo costo, no es necesario el desplazamiento de los suelos a descontaminar, genera menos residuos de material particulado, y la fuga de los contaminantes es menos importante; por otro lado, es una técnica que permite procesar mayores volúmenes de suelo.

No obstante, la EPA²² y Doménech²³ comentan que la degradación *In Situ* puede ser más lenta y difícil de dirigir; esta es más efectiva en terrenos permeables, es decir, terrenos preferiblemente arenosos y no compactados.

El objetivo de la biorremediación *In Situ* es introducir oxígeno y elementos nutritivos para estimular el trabajo de los microorganismos. Dos métodos han sido utilizados hasta el momento:

- Bioventilación (Bioventing): consiste en introducir aire de la atmósfera en el suelo, evitando el contacto con los niveles freáticos. La utilización de “flujos de aire”²⁴ es generalmente aplicada para el tratamiento de compuestos orgánicos volátiles o para estimular la acción de microorganismos específicos de la degradación presentes en el terreno. El nitrógeno y el fósforo pueden también ser agregados para aumentar el crecimiento de las poblaciones de microorganismos biodegradadores.

- Inyección de peróxido de hidrógeno (H₂O₂): comúnmente conocido como agua oxigenada, es puesto en circulación por el terreno para acelerar la actividad microbiana; se constituye como una “fuente de oxígeno”²⁵ para la remediación de suelos. Sin embargo, es de resaltar que las bacterias pueden ser afectadas por

²¹ ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). A citizen's guide to bioremediation [en línea]. Estados Unidos: Abril, 1996. [consultado 04 de Septiembre de 2006]. Disponible en Internet:

<http://www.epa.gov/tio/download/citizens/bioremediation.pdf#search=%22biorem%C3%A9diation%22>

²² Ibid.,

<http://www.epa.gov/tio/download/citizens/bioremediation.pdf#search=%22biorem%C3%A9diation%22>

²³ DOMÉNECH, Op. cit., p. 27

²⁴ BAKER, R., GHAEMGHAMI, J., SIMKINS, J., y MALLORY, L., CITES PAR ALLEMAN ET AL., Hydrocarbon bioremediation. United States: CRC Press, 1994. p. 496. ISBN 087-37-19840.

²⁵ ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, Op. cit.,
<http://www.epa.gov/tio/download/citizens/bioremediation.pdf#search=%22biorem%C3%A9diation%22>

esta solución, desarrollando sistemas de defensa contra el estrés oxidante (generación de enzimas implicadas en la degradación de especies que reaccionan al oxígeno como el peróxido de hidrógeno, el radical superóxido o el radical hidróxilo)²⁶.

5.2.2 Biorremediación *Ex Situ* de suelos. Consiste en extraer los suelos contaminados para su tratamiento en otro lugar. Según la EPA²⁷, se debe resaltar que este procedimiento permite tener un mejor control de los procesos, y puede ser aplicado a un mayor número de contaminantes y tipos de suelo.

Las técnicas *Ex Situ* incluyen:

- Biorremediación de fase semisólida o de lodos. Los suelos contaminados son combinados con agua y otros aditivos en un biorreactor, donde las condiciones son controladas (nutrientes, oxígeno, etc) con el fin de crear un medio óptimo para los microorganismos presentes en el suelo (propios al mismo), y así facilitar la degradación de los contaminantes. Al final del tratamiento, el agua es retirada de los suelos.
- Biorremediación de fase sólida. En este caso, factores como la humedad, temperatura, nutrientes y oxígeno se encuentran controlados con el fin de aumentar la biodegradación de los contaminantes. Los tratamientos son a menudo simples de utilizar y mantener en el tiempo, pero es necesario disponer de grandes extensiones de terreno. Dentro de esta técnica se incluye el compostaje, landfarming, entre otros.

²⁶ LABORATOIRE DE PHYSICOCHIMIE DES METAUX EN BIOLOGIE (PMB). Le peroxyde d'hydrogène : détection, élimination, utilisation [en línea]. France, Paris: Direction des sciences du vivant, 25 Oct., 2006. [consultado 7 de Noviembre de 2006]. Disponible en Internet :

http://www-dsv.cea.fr/content/cea/d_dep/d_drdc/d_pmb/theme2.htm#anchor-PerP

²⁷ ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, Op. cit.,

<http://www.epa.gov/tio/download/citizens/bioremediation.pdf#search=%22biorem%C3%A9diation%22>

5.3 LOS HIDROCARBUROS

Los hidrocarburos son compuesto orgánicos formados exclusivamente por átomos de carbono (C) e hidrógeno (H), y se obtienen principalmente del petróleo, alquitrán de hulla y fuentes vegetales²⁸.

Estos se dividían en dos grandes grupos de acuerdo a sus características químicas: alifáticos y cíclicos. Los primeros se caracterizan por tener una cadena lineal; entre estos se encuentran las parafinas (alcanos), las olefinas (alquenos y alcadienos), los acetilenos, y los terpenos acíclicos. En el caso de los cíclicos se presentan anillos cerrados; este grupo esta conformado por los alicíclicos (cicloparfinas – naftenos, ciclooleofinas y cicloacetilenos), los aromáticos y los terpenos cíclicos (monocíclico – dipenteno y dicíclico – pireno)²⁹.

Sin embargo, Ortiz³⁰ considera que estos compuestos también pueden ser clasificados según su proveniencia:

- Hidrocarburos biogénicos: sintetizados por casi todas las plantas, animales terrestres y marinos, incluyendo la microbiota, bacterias, plancton marino, diatomeas, algas y plantas superiores. Su síntesis esta controlada por las rutas metabólicas, y por tanto a la formación de mezclas de compuestos de limitada complejidad estructural.
- Hidrocarburos antrópicos: introducidos como resultado de cualquier tipo de actividad humana. Algunas de las principales fuentes son: combustión industrial, descargas de aguas municipales, actividades de transporte, derrames, entre otros.

Finalmente, existe una clasificación específica para los hidrocarburos de acuerdo a características específicas como son las variaciones en las longitudes de la cadena, en las ramificaciones de la cadena, en condensaciones del anillo, en

²⁸ Diccionario de química y de productos químicos. Barcelona: Ediciones Omega S.A., 1985. p. 457.

²⁹ Ibid., p. 457-458

³⁰ ORTIZ, R. Aspectos en la contaminación del suelo por hidrocarburos en México [en línea]. Monografías.com: 1997 [consultado 22 de Marzo de 2006]. Disponible en Internet: <http://www.monografias.com/trabajos7/hime/hime2.shtml>

combinaciones entre moléculas y la presencia de oxígeno, nitrógeno y azufre; así pues, encontramos actualmente “los alcanos (normal e iso), cicloalcanos, aromáticos, policíclicos aromáticos, asfaltinas y resinas”³¹.

5.4 LOS HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS (HAP)

5.4.1 Características generales de los HAP. Según Parrish et al.³², Diccionario de Química y de Productos Químicos³³ y Bouchez, et al.³⁴ Los hidrocarburos aromáticos policíclicos son compuestos orgánicos que se constituyen principalmente de átomos de carbono (C) e hidrógeno (H) y; contienen al menos dos ciclos aromáticos fusionados, es decir, anillos hexagonales de 6 carbonos con 3 enlaces dobles (conocidos también como anillos aromáticos o bencénicos). Son compuestos muy reactivos y químicamente versátiles; su fuerte olor da origen a su nombre.

El número de ciclos de los HAP varia de 2 ciclos fusionados (naftaleno) hasta 6 ciclos (benzo(ghi)perileno); su formula empírica es “ $C_{4n+2}H_{2n+4}$ ”³⁵, donde n representa el número de anillos aromáticos. Es de Resaltar que la distribución de los anillos puede ser lineal (antraceno), angular (fluoranteno) o grupal (pireno). La EPA³⁶ ha establecido una lista de 16 HAP, considerados como los contaminantes prioritarios para el hombre (figura 3).

El origen de los hidrocarburos aromáticos policíclicos es atribuido principalmente a las actividades industriales, los procesos de incineración, producción de energía, emisiones atmosféricas vehiculares y la calefacción residencial. Estos hidrocarburos se producen a altas temperaturas, entre “400°C – 500°C”³⁷ o entre

³¹ EWEIS, Op. cit., p. 3

³² PARRISH, Z.D., ET AL. Accumulation of weathered polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by plants and earthworm species. En: Chemosphere. Vol. 11, No. 003 (2005); p 1-10.

³³ Diccionario de química y de productos químicos, Op cit., p. 87 y 458.

³⁴ BOUCHEZ M., ET AL. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques dans l'environnement. Propriétés, origines, devenir. En: Revue de l'institut français du pétrole. Vol. 51, No. 3 (1996); p. 407-419.

³⁵ EWEIS, Op. cit., p. 6

³⁶ ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, Op. cit.

<http://www.epa.gov/tio/download/citizens/bioremediation.pdf#search=%22biorem%C3%A9diation%22>

³⁷ ORTIZ, Op. cit., <http://www.monografias.com/trabajos7/hime/hime2.shtml>

“1500°C – 2000°C”³⁸, durante la combustión incompleta de la materia orgánica reciente o fósil. También es de tener en cuenta que los HAP se generan también en las “fugas o accidentes petroleros”³⁹ que se producen en el medio ambiente.

Es de mencionar que según Peña et al.⁴⁰, el grado de formación y naturaleza de los HAP se encuentran determinados por diversos factores como el tipo y cantidad de combustible, temperatura, duración de la combustión y disponibilidad de oxígeno.

Por otro lado, hay que señalar que estos compuestos orgánicos nacen también naturalmente en el ambiente por: (i) pirolisis⁴¹, a través de fenómenos como incendios forestales y volcanismo; (ii) biosíntesis directa realizada por los microorganismos o los vegetales⁴²; (iii) por diagénesis precoz en los sedimentos⁴³.

En el estado puro y a temperaturas ambiente, los HAP se presentan en forma de cristales sólidos⁴⁴.

5.4.2 Propiedades físico-químicas de los HAP. Los hidrocarburos aromáticos policíclicos son contaminantes persistentes y ubicuos que, según sus características específicas, pueden tener una distribución y efecto diferentes en el medio ambiente.

³⁸ BOUCHEZ, Op. cit., p. 407 – 419

³⁹ ORTINEZ, O., IZE, I, y GAVILÁN A. La restauración de suelos contaminados con hidrocarburos en México. En: Gaceta Ecológica – INE Semarnat México. Vol. 096 (2003); p. 83-92.

⁴⁰ PEÑA, A., ET AL. Extracción en fase sólida como una alternativa para el procedimiento de limpieza en la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos por cromatografía de gases: aplicación a organismos marinos. En: Revista internacional de contaminación ambiental. Vol 19, No. 001 (2003), p. 13-23.

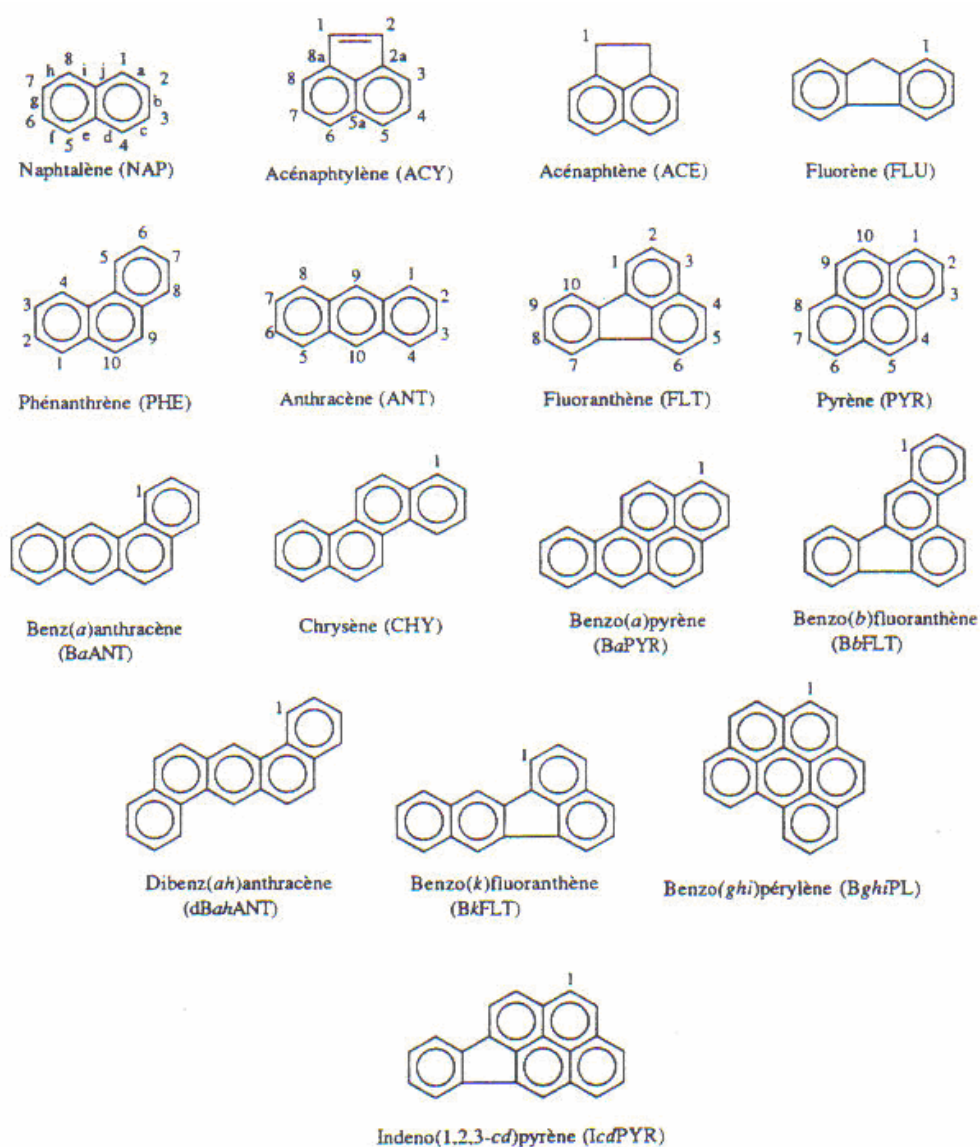
⁴¹ BLUMER, M. y YOUNGBLOOD, W. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soils and Recent Sediments. En: Revue Science. Vol. 188, No. 4183 (1975); p. 53-55.

⁴² MINISTRE DES APPROVISIONNEMENTS ET SERVICES CANADA. Liste des substances d'intérêt prioritaire, rapport d'évaluation: Hydrocarbures aromatiques polycycliques ». Loi canadienne sur la protection de l'environnement, NATIONAL PRINTERS (OTTAWA) INC., 1994. p. 76. ISBN 0-662-99956-8.

⁴³ HENNER, P., ET AL. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) occurrence and remediation methods. En: Analisis. Vol. 25, No. 9-10 (1997); p. 56-59.

⁴⁴ AMELLAL, S. Biodégradation, mobilité et stabilisation du phénanthrène dans deux sols agricoles Lorraine, 2004. p. 163. Tesis Doctoral: Sciences Agronomiques. L'Institut National Polytechnique de Lorraine en Sciences Agronomiques.

Figura 3. Estructura molecular de los 16 HAP prioritarios propuestos por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos – EPA



Fuente: AMELLAL, S. Biodégradation, mobilité et stabilisation du phénanthrène dans deux sols agricoles Lorraine, 2004. p. 163. Tesis Doctoral: Sciences Agronomiques. L'Institut National Polytechnique de Lorraine en Sciences Agronomiques.

Bouchez, et al.⁴⁵, y Blumer⁴⁶, indican que el ordenamiento de los anillos bencénicos de los diferentes HAP determina su estabilidad. Cuando los ciclos aromáticos tienen una distribución lineal, los compuestos son menos estables; sin embargo, la estabilidad de las moléculas aumenta para los HAP angulares.

Por otro lado, el peso molecular es una de las características más importantes para la clasificación de estos compuestos aromáticos. Los HAP de bajo peso molecular son aquellos que contienen entre 2 y 3 ciclos aromáticos en su estructura molecular; el segundo grupo lo conforman los hidrocarburos de 4 a 6 ciclos (HAP de alto peso molecular). La complejidad de estos compuestos aromáticos es determinante para conocer su comportamiento y las consecuencias que pueden generar en un medio determinado (agua, aire o suelo).⁴⁷

Constatamos que a medida que el peso molecular de los HAP aumenta, su movilidad en el ambiente disminuye⁴⁸. En lo concerniente al primer grupo de aromáticos, la presión de vapor saturante es de 10^{-4} atm, lo cual indica una afinidad a volatilizarse en la atmósfera; los HAP del segundo grupo tienden a quedar atrapados en el suelo (su presión de vapor es igual a 10^{-3} atm)⁴⁹.

Por otro lado, Ortiz⁵⁰, Bouvier⁵¹ y Blondel⁵² consideran que la solubilidad en medio acuoso disminuye también con el aumento del peso molecular. Se debe resaltar que los HAP con estructuras complejas son más hidrofóbicos (es decir que tienen poca afinidad al agua), lo que genera un reforzamiento de su carácter lipofílico. La hidrofobicidad se encuentra igualmente ligada a la polaridad; en efecto, los compuestos no polares o débilmente polares tienen una propensión por las fases

⁴⁵ BOUCHEZ, Op. cit., p. 407 – 419

⁴⁶ BLUMER, Op. cit., p. 53-55

⁴⁷ GABET, S. Remobilisation d'Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) présents dans les sols contaminés à l'aide d'un tensioactif d'origine biologique. Limoges, 2004. p. 186. Tesis Doctoral: Chimie et Microbiologie de l'Eau. Université de Limoges. Facultad de Sciences et Techniques.

⁴⁸ ORTIZ, Op. cit., <http://www.monografias.com/trabajos7/hime/hime2.shtml>

⁴⁹ BOUCHEZ, Op. cit., p. 407 – 419

⁵⁰ ORTIZ, Op. cit., <http://www.monografias.com/trabajos7/hime/hime2.shtml>

⁵¹ BOUVIER, D. Structure et dynamique moléculaires en biologie [en línea]. France: ARPe-Biochimie Université Paris 6, 06 de Sept., 1999. [consultado 09 de Octubre de 2006]. Disponible en Internet :

<http://www.snv.jussieu.fr/enseignement/ARPE/td/pol.html>

⁵² BLONDEL, T. Pollution souterraine : paramètres et paramétrage des modèles en écoulement et en transport des polluants [en línea]. France: Cabinet conseil BLONDEL, Septiembre, 2001. [consultado 09 de Octubre de 2006]. Disponible en Internet: <http://www.ccblondel.com/html/accueil.htm>

orgánicas hidrofóbicas en ácido húmico. Las moléculas que contienen carbono e hidrógeno presentan una diferencia de electronegatividad débil entre sus átomos, de ahí su baja polaridad; este es el caso de los hidrocarburos aromáticos.

Es de mencionar que la polaridad de los compuestos determina su afinidad con la materia orgánica⁵³. A través de las “interacciones de Van der Waals”⁵⁴, las moléculas no polares reaccionan con la materia orgánica; esto explica la asociación de los HAP con los medios que presentan altas cantidades de materia orgánica⁵⁵. Debido a la limitada solubilidad de los hidrocarburos aromáticos, estos son propensos a ser fuertemente ligados a la materia orgánica en los suelos⁵⁶.

Los HAP de alto peso molecular son por tanto considerados como más resistentes; la tabla a continuación (Tabla 2) describe algunas de las propiedades físico-químicas de algunos de los HAP prioritarios.

5.4.3 Genotoxicidad y toxicidad de los HAP. Los hidrocarburos aromáticos policíclicos son reconocidos por los efectos sobre el organismo humano. Los primeros estudios sobre la genotoxicidad de los HAP se remontan al final del siglo XVIII (cáncer de la piel provocado por los alquitranes en los deshollinadores⁵⁷). Sin embargo, desde los años 1960 las investigaciones sobre su carácter mutagénico y cancerígeno han progresado⁵⁸.

Los HAP no son mutagénicos en si mismo, pero provocan reacciones que pueden generar modificaciones del material genético (mutaciones). Para algunos organismos, incluidos los marinos, la actividad del “citocromo P-450”⁵⁹ presente en el tejido animal, es inducido por la presencia de los hidrocarburos aromáticos; esto provoca una reacción de detoxificación de los productos xenobióticos ingeridos que conduce a la formación de metabolitos mutagénicos y cancerígenos (fenómeno conocido como la “biotoxificación”⁶⁰).

⁵³ BOUCHEZ, Op. cit., p. 407 – 419

⁵⁴ ORTINEZ, Op. cit., p. 83-92

⁵⁵ GABET, Op. cit., p. 186

⁵⁶ SHUTTLEWORTH, K. y CERNIGLIA C. Environmental aspects of PAH biodegradation. En: Biochemistry and biotechnology. Vol. 54 (1995); p. 291-302.

⁵⁷ BOUCHEZ, Op. cit., p. 407 – 419

⁵⁸ AMELLAL, Op. cit., p. 163

⁵⁹ BOUCHEZ, Op. cit., p. 407 – 419

⁶⁰ SUDIP, S., OM, S., y RAKESH, J. Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. En: Trends in biotechnology. Vol. 20, No. 6 (2002); p. 243-248.

Tabla 2. Propiedades físico-químicas de los HAP

| HAP | Número de ciclos aromáticos | Masa molecular (g.mol ⁻¹) | Punto de fusión (°C) | Punto de ebullición (°C) | Solubilidad ^(a) (mg.L ⁻¹) |
|------------------|-----------------------------|---------------------------------------|----------------------|--------------------------|--|
| Naftaleno | 2 | 128,2 | 80 | 218 | 32 |
| Acenaftileno | 3 | 152,2 | 82 | 270 ^(b) | 3,93 |
| Acenafteno | 3 | 154,2 | 93 | 279 | 3,42 |
| Fluoreno | 3 | 166,2 | 116 | 294 | 1,9 |
| Fenantreno | 3 | 178,2 | 100 | 338 | 1,0 |
| Antraceno | 3 | 178,2 | 216 | 340 | 0,07 |
| Fluoranteno | 4 | 202 | 107 | 383 | 0,27 |
| Pireno | 4 | 202 | 150 | 393 | 0,16 |
| Benz(a)antraceno | 4 | 228,2 | 156 | 435 ^(c) | 0,0057 |
| Criseno | 4 | 228,2 | 254 | 441 | 0,006 |
| Benz(a)pireno | 5 | 252 | 179 | 496 | 0,0038 |

Adaptado por el autor:

Fuente: BOUCHEZ M., et al. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques dans l'environnement. Dégradation par voie microbienne. En: Revue de l'institut français du pétrole. Vol 51, No. 6 (1996); p. 797-828.

AMELLAL, S. Biodégradation, mobilité et stabilisation du phénanthrène dans deux sols agricoles Lorraine, 2004. p. 163. Tesis Doctoral: Sciences Agronomiques. L'Institut National Polytechnique de Lorraine en Sciences Agronomiques.

a : Solubilidad en el agua de los cristales a 25°C; b : Se descompone parcialmente ; c: Sublimable

En la tabla 3 se constata que el carácter cancerígeno y mutagénico de los HAP aumenta con el peso molecular. En efecto, se considera que estas características aparecen principalmente a partir de los hidrocarburos aromáticos de 4 ciclos. Según Henner et al.⁶¹, y Bouchez⁶², et al. el naftaleno (HAP inferior), no aparece como cancerígeno o mutagénico. Sin embargo, Sudip, et al.⁶³ indican que un envenenamiento agudo con naftaleno puede generar anemia hemolítica en una nefrotoxicidad; afecciones en la piel y los ojos han sido también observadas para los trabajadores expuestos a este tipo de hidrocarburo aromático.

⁶¹ HENNER, Op cit., p. 56-59

⁶² BOUCHEZ, Op. cit., p. 407 – 419

⁶³ SUDIP, Op. cit., p. 243-248

Tabla 3. Carácter cancerígeno y mutagénico de los HAP según el IARC (1986)

| HAP | Masa molecular (g.mol ⁻¹) | Cancerogénesis (a) | Genotoxicidad a corto plazo (b) | Mutagénesis (c) |
|--|---------------------------------------|--------------------|---------------------------------|-----------------|
| Fluoreno | 166,2 | I | L | - |
| Fenantreno | 178,2 | I | L | + |
| Antraceno | 178,2 | N | N | - |
| Fluoranteno ⁽²⁾ | 202 | N | L | + |
| Pireno | 202 | N | L | + |
| Benz(a)antraceno ⁽¹⁾ | 228,2 | S | S | + |
| Criseno ⁽¹⁾ | 228,2 | L | L | + |
| Benzo(a)pireno ^(1, 2) | 252 | S | S | + |
| Benzo(b)fluoranteno ^(1, 2) | 252,3 | S | I | + |
| Benzo(k)fluoranteno ^(1, 2) | 252,3 | S | I | + |
| Benzo(g,l,i)perileno ⁽²⁾ | 276,3 | I | I | + |
| Indeno(1,2, 3-c,d)pireno ^(1, 2) | 276,3 | S | I | + |
| Dibenz(a,h)antraceno | 278,4 | S | S | + |

Adaptado por el autor:

Fuente : BOUCHEZ M., et al. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques dans l'environnement. Dégradation par voie microbienne. En: Revue de l'institut français du pétrole. Vol 51, No. 6 (1996); p. 797-828.

AMELLAL, S. Biodégradation, mobilité et stabilisation du phénanthrène dans deux sols agricoles Lorraine, 2004. 163 p. Tesis Doctoral: Sciences Agronomiques. L'Institut National Polytechnique de Lorraine en Sciences Agronomiques.

1 : HAP perteneciente a la lista de los 7 HAP cancerígenos y presentes en cantidades importantes en el aire y los alimentos (Kramer et van der Heijden, 1990). 2 : HAP perteneciente a la lista de 6 HAP retenidos por la norma europea relativa al agua potable.

a : Por experimentación animal : pruebas cancerígenas suficientes (S) o limitadas (L) ; datos ausentes o insuficientes (I) ; no cancerígeno (N). b : prueba de genotoxicidad a corto termino (deterioración del ADN, mutagénico, anomalías cromosomales). c : Mutagénesis en el test de *Salmonella typhimurium* de Ames et al. (1975), resultados positivos (+), negativos (-)

Allard, et al. ⁶⁴ y Peña ⁶⁵, et al. indican que algunos HAP son considerados como contaminantes ambientales, porque se acumulan en las cadenas alimenticias provocando posibles consecuencias adversas. Debido a su carácter liposoluble,

⁶⁴ ALLARD A.S., ET AL. Accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons from creosote-contaminated soil in selected plants and the oligochaete worm *Enchytraeus crypticus*. En: Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng. Vol. 40, No. 11 (2005); p. 2057-2072.

⁶⁵ PEÑA, Op. cit., p. 13-23

los hidrocarburos aromáticos son absorbidos por el sistema intestinal; rápidamente, se distribuyen en los diferentes tejidos (principalmente sobre las partes grasas)⁶⁶. La introducción de estos compuestos aromáticos en el organismo puede también realizarse por contacto con la piel o por inhalación; según las “vías de administración”⁶⁷ utilizadas en las experiencias In Vitro, el poder cancerígeno de los HAP es más o menos elevado y la localización de los tumores varía⁶⁸.

En cuanto a los efectos toxicológicos de los HAP, se considera que una alta concentración de estos compuestos aromáticos puede afectar la acción de los microorganismos degradadores, o de las plantas que sirven como estimuladores de la remediación.

La severidad de la contaminación por hidrocarburos aromáticos policíclicos en el suelo puede limitar el desarrollo normal de plantas; los estudios de Chaudhry, et al.⁶⁹ sobre el crecimiento de las raíces muestra que las plantas (según su tipo) pueden sobrevivir a una determinada concentración. La germinación de las semillas puede también ser afectada por la contaminación existente en el medio; Allard, et al.⁷⁰ observan que la germinación de *Trifolium repens* es inferior a la de *Lolium perenne* (siendo esta inferior a la de *Raphanus sativus*) bajo las mismas condiciones de contaminación por hidrocarburos aromáticos policíclicos en el suelo. Por otro lado, el BTX (Benceno-tolueno-xileno, un hidrocarburo monoaromático) es considerado inhibidor del crecimiento de las plantas⁷¹. BIDET et al.⁷² sugieren también que la presencia de HAP puede provocar una disminución de la cantidad de agua acumulada en el suelo, debido a sus propiedades hidrofóbica, alterando así el ciclo de las plantas.

Se constata también que el potencial tóxico de los HAP disminuye cuando se encuentran fuertemente ligados a la materia orgánica presente en el suelo.

⁶⁶ SUDIP, Op. cit., p. 243-248

⁶⁷ BOUCHEZ, Op. cit., p. 407 – 419

⁶⁸ HENNER, Op cit., p. 56-59

⁶⁹ CHAUDHRY, Q., ET AL. Utilising the synergy between plants and rhizosphere microorganism to enhance breakdown of organic pollutants in the environment (Review articles). En: Environ Sci & Pollut Res. Vol. 12, No. 1 (2005); p. 34-48.

⁷⁰ ALLARD, ET AL., Op. cit., p. 2057-2072

⁷¹ HENNER, Op cit., p. 56-59

⁷² BINET, Ph., ET AL. Fate of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in the rhizosphere and mycorrhizosphere of ryegrass. En: Plant and soil. Vol. 227 (2000); p 207-213.

Además, la degradación de los HAP puede inhibirse por la presencia de otros HAP en el lugar⁷³.

5.4.4 HAP en el medio ambiente. Las características de los hidrocarburos aromáticos policíclicos descritas anteriormente determinan los diferentes comportamientos y dispersión en el ambiente.

♦ Los HAP en la atmósfera. El aire es uno de los principales receptores de hidrocarburos aromáticos policíclicos, debido a su origen pirolítico; una vez liberados estos compuestos pueden dispersarse en fase gaseosa, o ser adsorbidos en las partículas.

Los HAP adsorbidos sobre las partículas (principalmente las cenizas o los óxidos metálicos) van a ser transportados en grandes distancias desde el punto de emisión, hasta que son depositados y acumulados en el suelo, el agua o la vegetación; el tiempo de suspensión en el aire y la distancia del recorrido dependen de la masa molecular de dichos compuestos aromáticos, el tamaño del aerosol o de las partículas, y las condiciones meteorológicas como son las corrientes de aire y las precipitaciones. Se resalta que existe también una correlación entre un fuerte contenido de HAP en el suelo y la proximidad a la fuente emisora⁷⁴. Por otro lado, los hidrocarburos aromáticos que se presentan en fase gaseosa engloban principalmente los compuestos de bajo peso molecular⁷⁵.

Se constata también que dependiendo de su estada en la atmósfera, los HAP van a ser degradados por fotodescomposición (principalmente para los de bajo peso molecular, muy sensibles a la luz). Los compuestos aromáticos adsorbidos por las partículas dan origen a “derivados nitrados por reacción con los óxidos de nitrógeno, o también a quinonas, cetonas o ácidos de foto-oxidación”⁷⁶.

♦ Los HAP en el agua. La baja solubilidad e hidrofobicidad de los hidrocarburos aromáticos policíclicos de alto peso molecular los hace migrar en el

⁷³ SHUTTLEWORTH, Op. cit., p. 291-302

⁷⁴ AMELLAL, Op. cit., p. 163

⁷⁵ BOUCHEZ, Op. cit., p. 407 – 419

⁷⁶ Ibid., p. 407 - 419

agua como “material en suspensión o de coloides” ⁷⁷ (asociados a sustancias orgánicas u organometálicas provenientes de la erosión del suelo) para luego ser depositados y acumulados finalmente en los sedimentos subyacentes. Baumard, et al. ⁷⁸ comentan que Las concentraciones de HAP medidas en los sedimentos pueden estar entre “1 y 20.500 ng/g.”

Los HAP de bajo peso molecular, un poco más solubles, pueden permanecer en el agua en forma libre y por tanto desplazarse en distancias más importantes. En el agua, estos compuestos aromáticos pueden ser degradados por fotodescomposición debido a su exposición a la luz.

Los océanos y los mares se constituyen como uno de los principales medios afectados por los HAP porque funcionan como lugar de almacenamiento de grandes cantidades de sustancias hidrofóbicas contaminantes. Los hidrocarburos aromáticos estabilizados por los sedimentos marinos van a encontrarse dentro de las cadenas tróficas, afectando así no solamente los organismos que habitan el agua sino también aquellos que se encuentran directa o indirectamente asociados a ellos ⁷⁹.

Así mismo, se subraya que las fuentes de agua subterránea pueden ser receptores de los HAP transportados hacia horizontes inferiores del suelo, por la acción del agua sobre las partículas ⁸⁰. Esta migración es por el contrario lenta ⁸¹.

⁷⁷ READMAN, J.W., ET AL. Aquatic distribution and heterotrophic degradation of PAH in the Tamer estuary. En: Estuarine Coastal and Shelf Science. Vol. 14 (1982); p. 311-321.

⁷⁸ BAUMARD, P., ET AL. Polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments and mussels of the western méditerranean sea. En: Environmental Toxicology and Chemistry. Vol. 17, No. 5 (1998); p. 765-776.

⁷⁹ DIONISI, H. Potencial de biorremediación intrínseca de hidrocarburos aromáticos policíclicos en sedimentos marinos [en línea]. Laboratorio de Microbiología ambiental, Unidad de Investigación de Oceanografía y Meteorología CENPAT-CONICET: Enero, 2006. [consultado 17 de Abril de 2006]. Disponible en Internet: http://www.cenpat.edu.ar/fisicambien/microb_amb.htm

⁸⁰ HENNER, Op. cit., p. 56-59

⁸¹ EWEIS, Op. cit., p. 18

♦ Los HAP en el suelo. El suelo es un receptor potencial de hidrocarburos aromáticos policíclicos; estos compuestos orgánicos van a ser transportados por el aire y el agua hasta ser depositados en el suelo o los sedimentos. En este medio, los procesos de fotodescomposición o volatilización afectan principalmente a los HAP de bajo peso molecular, ubicados en la superficie y expuestos a la luz.

Los HAP serán inmovilizados dentro de los poros del suelo, fijados por enlace covalentes y/o de hidrógeno, o estabilizados durante los procesos de humificación⁸². Los suelos que presentan un alto contenido de materia orgánica presentan concentraciones de HAP más elevadas⁸³.

Por otro lado, el tiempo de vida media de los HAP en el suelo aumenta a medida que el número de anillos aromáticos es más importante. Según Wild et al (citado por Bouchez, et al., 1996)⁸⁴ el tiempo de vida media del naftaleno es aproximadamente inferior a 2.1 años, mientras que, en el mismo terreno, el benzo(a)pireno es de 8.2 años. Los tiempos de vida media promedio en el suelo para algunos HAP se presentan en la tabla 4.

Se constata que los tiempos de vida promedio de estos compuestos aromáticos dependen no solamente de las características físico-químicas del suelo, pero de su historia; en efecto, los HAP son más recalcitrantes con el tiempo. La mayoría de las experiencias y experimentos utilizan suelos que no provienen de sitios actualmente contaminados, y los HAP son adicionados justo antes de la puesta en marcha de la técnica de degradación (es decir que los compuestos orgánicos van a estar más disponibles y en condiciones muy diferentes a las de la realidad). Se aconseja entonces de no subestimar el potencial de degradación de los HAP en el terreno⁸⁵.

Las bacterias y los hongos juegan un rol importante en la remediación de los HAP; son los principales actores de la degradación de HAP presentes en los diferentes horizontes del suelo⁸⁶. Los compuestos orgánicos que presentan un bajo peso molecular y una estructura más simple van a ser fácilmente degradados por los

⁸² HENNER, Op. cit., p. 56-59

⁸³ BOUCHEZ, Op. cit., p. 407 – 419

⁸⁴ Ibid., p. 407 – 419

⁸⁵ SHUTTLEWORTH, Op. cit., p. 291-302

⁸⁶ BOUCHEZ, Op. cit., p. 797-828

microorganismos, mientras que los HAP que contienen más de 4 ciclos aromáticos serán más resistentes⁸⁷.

Tabla 4. Tiempos de vida media de los HAP en el suelo

| HAP | Masa molecular (g/mol) | Tiempo de vida media promedio en el suelo * | | Tiempo de vida media promedio (días) de los HAP en diferentes sistemas ** | | |
|-----------------------------|------------------------|---|------------------------------------|--|---|---------|
| | | Terreno (año) | Laboratorio (semanas) ^a | Suelo enriquecido con HAP contenidos en lodos de estación de depuración ^b | Dos suelos arenosos - mantillos enriquecidos con HAP ^c | |
| Naftaleno | 128, | < 2,1 | 0,02 - 46 | 28 ± 16 | 2.1 | 2.2 |
| Acenafteno / Fluoreno | 154,2 / 166,2 | < 3,2 | 0,04 - 6 | -- | -- | -- |
| Fenantreno | 178,2 | 5,7 | 0,4 - 26 | 124 ± 48 | 16 | 35 |
| Antraceno | 178,2 | 7,9 | 0,5 - 26 | 141 ± 78 | 134 | 50 |
| Fluoranteno | 202 | 7,8 | 17 961 | 137 ± 35 | 377 | 268 |
| Pireno | 202 | 8,5 | 0,4 – más de 90 | 225 ± 92 | 260 | 199 |
| Benzo(a)antraceno / Criseno | 228,2 | 8,1 | 0,6 - 157 | -- | - / 371 | --/ 387 |
| Benzo(a)pireno | 252 | 8,2 | 0,3 – más de 300 | 211 ± 69 | 309 | 229 |

Adaptado por el autor:

Fuente : * BOUCHEZ M., BLANCHET D., HAESELER F., y VANDECASTEELE J.P. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques dans l'environnement. Propriétés, origines, devenir. En: Revue de l'institut français du pétrole. Vol. 51, N° 3 (1996); p. 407 – 419.

** SHUTTLEWORTH, K. y CERNIGLIA C. Environmental aspects of PAH biodegradation. En: Biochemistry and biotechnology. Vol. 54 (1995); p. 291-302.

a : Muestras de suelo que contienen HAP adicionados ; b : Promedio de SD para 4 tipos de suelos enmendados con HAP contenidos en lodos de estaciones de depuración (humedad de 25-60% , 20-30°C), los valores incluyen las pérdidas abióticas; c : HAP fueron adicionados a los suelos que no tenían una exposición importante a los HAP (incubación a -33J/kg de potencial de agua, 20°C), los valores no incluyen las pérdidas abióticas

⁸⁷ EWEIS, Op. cit., p. 136

5.5 BIORREMEDIACIÓN DE LOS HAP EN EL SUELO

Diferentes investigaciones muestran la capacidad de ciertas bacterias, hongos y plantas para degradar los hidrocarburos aromáticos policíclicos; hoy en día, las técnicas que integran microorganismos y plantas para la descontaminación de los diferentes sustratos son cada vez más utilizadas.

5.5.1 Biodegradación Bacteriana de los HAP en el suelo. Varios tipos de bacterias han sido aisladas para conocer la capacidad de utilizar HAP (principalmente de dos a cuatro ciclos aromáticos) como única fuente de carbón. En efecto, las bacterias utilizan estos compuestos orgánicos como sustrato de crecimiento, conduciendo a su degradación; algunos ejemplos de bacterias degradadoras de HAP se presentan en la tabla 5.

La degradación de los HAP por la bacterias es un proceso esencialmente aeróbico. Es de resaltar que puede haber una degradación completa de los HAP en CO_2 (mineralización), generando entonces el crecimiento de los microorganismos; o una degradación parcial, que conduce a la “acumulación de metabolitos”⁸⁸. Se constata también que los compuestos más simples producidos durante la degradación no son necesariamente diferentes a los HAP iniciales, en lo que concierne su volatilización, absorción o lixiviación⁸⁹.

Algunos estudios indican que puede haber una degradación anaeróbica de los HAP a través de la utilización de aceptores de electrones, como los nitratos, sulfatos y compuestos metálicos. Estos aceptores son más fáciles de proporcionar que el oxígeno⁹⁰. Pero, Chang, et al. (2002)⁹¹ consideran que la degradación realizada por asociaciones de colonias de microorganismos anaeróbicos o facultativos es menos importante; la degradación de los HAP es inhibida en condiciones anaeróbicas.

⁸⁸ BOUCHEZ, Op. cit., p. 797-828

⁸⁹ SHUTTLEWORTH, Op. cit., p. 291-302

⁹⁰ BOUCHEZ, Op. cit., p. 797-828

⁹¹ CHANG, B.V., ET AL. Anaerobic biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon in soil. En: Chemosphere. Vol. 48, No. 7 (2002); p. 717-724.

Tabla 5. Bacterias específicas de la degradación de HAP

| HAP | Número de ciclos | Bacterias |
|-------------------|------------------|---|
| Naftaleno | 2 | Acinetobacter, Aeromonas, Alcaligenes, Bacillus, Corynebacterium, Gordona, Moraxella, Mycobacterium, Pseudomonas, Rhodococcus, Streptomyces |
| Antraceno | 3 | Arthrobacter, Beijerinckia, Flavobacterium, Mycobacterium, Pseudomonas, Rhodococcus |
| Fenantreno | 3 | Acinetobacter, Aeromonas, Alcaligenes, Arthrobacter, Beijerinckia, Flavobacterium, Gordona,, Micrococcus, Mycobacterium, Nocardia, Pseudomonas, Rhodococcus, Streptomyces, Vibrio |
| Fluoreno | 3 | Rhodococcus |
| Fluoranteno | 4 | Alcaligenes, Gordona, Mycobacterium, Pseudomonas, Rhodococcus |
| Pireno | 4 | Alcaligenes, Gordona,, Pseudomonas, Mycobacterium, Rhodococcus |
| Benzo(a)antraceno | 4 | Alcaligenes, Beijerinckia, Pseudomonas, |
| Benzo(a)pireno | 5 | Beijerinckia, Mycobacterium |

Adaptado por el autor:

Fuente: BOUCHEZ M., ET.AL. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques dans l'environnement. Dégradation par voie microbienne. En: Revue de l'institut français du pétrole. Vol 51, No. 6 (1996); p. 797-828.

SUDIP, S., OM, S., y RAKESH, J. Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. En: Trends in biotechnology. Vol. 20, No. 6 (2002); p. 243-248.

Se constata que la degradación de los HAP está también ligada a las condiciones físico-químicas y medioambientales de los suelos⁹². De hecho, estos factores pueden afectar el proceso, retrasando o acelerando el trabajo de los microorganismos⁹³. Una clasificación de estas condiciones fue propuesta por Eweis, et al.⁹⁴; como factores medioambientales se consideran las variaciones en temperatura, pH, presencia de hidrógeno o la disponibilidad de nutrientes y oxígeno. Los factores físicos hacen referencia a la disponibilidad de los contaminantes, la presencia de agua y la provisión de aceptores de electrones

⁹² DOMÉNECH, Xavier. Op. cit., p. 27

⁹³ AMELLAL, Op. cit., p. 163

⁹⁴ EWEIS, Op. cit., p. 20-23

apropiados. Finalmente, los factores químicos corresponden principalmente a las características particulares de los compuestos aromáticos descritos anteriormente.

El estudio de Chang et al. (2002)⁹⁵ concerniente a la degradación de los HAP de los suelos contaminados de Taida por efluentes petroquímicos utilizando una asociación de microorganismos adaptados, concluye que un pH 7 y una temperatura de 30°C aproximadamente, mejora la velocidad de degradación de los compuestos aromáticos estudiados (fenantreno, pireno, antraceno, fluoreno y acenafteno). Por otro lado, el contenido en materia orgánica en el suelo ayuda a la biodisponibilidad de los HAP; además, los autores subrayan que la solubilidad de los compuestos aumenta a medida que la hidrofobicidad del suelo crece. Finalmente, ellos consideran que una alta concentración en hidrocarburos aromáticos puede aumentar los niveles de toxicidad.

Shuttleworth, et al.⁹⁶ constatan que la biodisponibilidad esta ligada a la capacidad de desorción de los HAP en el suelo; una fuerte desorción aumenta la velocidad de degradación de las bacterias. Además, el tiempo de vida media (como única variable para el análisis de degradación de dichos compuestos) no es suficiente para determinar el potencial de eficacia de la biorremediación de los HAP, puesto que las velocidades de degradación no son lineales; estas decrecen con el transcurso del tiempo si existe una disminución de algún nutriente (como el oxígeno) o de la biodisponibilidad de los HAP.

Se destaca que los tipos de microorganismos presentes en el suelo y su densidad también son factores determinantes de la degradación de los HAP. A menudo, algunas técnicas de biorremediación enriquecen los suelos con bacterias específicas para obtener mejores niveles de degradación. Se constata que las técnicas incluyen igualmente la utilización de bacterias oriundas de los suelos y la inoculación de nutrientes para ayudar el proceso de degradación)⁹⁷.

5.5.2 Fitorremediación de los HAP en el suelo. Las plantas intervienen también en la degradación de los compuestos orgánicos presentes en el suelo⁹⁸; los principales mecanismos conciernen la fitoestabilización, la fitoextracción, la fitoacumulación, la fitotransformación, la fitotranspiración y la remediación a nivel rizomal⁹⁹. En lo que respecta a los hidrocarburos aromáticos policíclicos, los

⁹⁵ CHANG, Op. cit., p. 717-724

⁹⁶ SHUTTLEWORTH, Op. cit., p. 291-302

⁹⁷ DOMÉNECH, Xavier. Op. cit., p. 32

⁹⁸ CHAUDHRY, Op. cit., p. 34-48

⁹⁹ PARRISH, Op. cit., p. 1-10

estudios se interesan sobre su acumulación en las plantas y las relaciones microorganismos-plantas en la degradación.

La fitoacumulación de los HAP varía según el tipo de planta y sus respectivas partes (raíces, tallos, hojas); se considera que el transporte de los HAP dentro de la planta está determinado por las relaciones suelo/agua, suelo/raíces, atmósfera/hojas, suelo/atmósfera. Según Allard, et al.¹⁰⁰, se constata que existe una relación lineal entre la concentración de HAP en el suelo y la planta, pero ellos observan además que dicha concentración disminuye para los tallos y las hojas con respecto a la parte subterránea de la planta. De hecho, Chaudhry, et al.,¹⁰¹ subraya que la acumulación y el traspaso de los compuestos aromáticos por medio de la transpiración de las plantas mayores es limitada para los compuestos fuertemente ligados al suelo y altamente lipofílicos, como es el caso de los HAP. Bouchez, et al.¹⁰² y Binet, et al.¹⁰³ consideran que la presencia de los HAP en la parte aérea de la planta se debe principalmente a una contaminación por deposición atmosférica.

En lo que concierne la raíz, la acumulación de los HAP se debe a menudo a la adsorción más que a la absorción por la planta. Los trabajos de investigación de Binet, et al.¹⁰⁴ muestran que la totalidad del antraceno (8 µg agregados al suelo en forma de solución al principio de los experimentos) fue recuperado por lavado de las raíces de las plantas; además, un experimento efectuado con 8 HAP muestra que solamente el 0.012% de la cantidad inicial fue recuperada sobre o dentro de la raíz.

Por otro lado, existe una interacción sinérgica entre las plantas y las comunidades microbianas a nivel de la rizósfera. Los exudados secretados por las raíces proporcionan a los microorganismos diversos nutrientes necesarios para su crecimiento, esto conduce a una estimulación de la degradación de los compuestos aromáticos; se produce entonces una disminución de la toxicidad del suelo. Simultáneamente, la planta va a beneficiarse por el aumento de la biodisponibilidad de nutrientes y la disminución de la fototoxicidad de los HAP¹⁰⁵.

¹⁰⁰ ALLARD, ET AL., Op. cit., p. 2057-2072

¹⁰¹ CHAUDHRY, Op. cit., p. 34-48

¹⁰² BOUCHEZ, Op. cit., p. 407 – 419

¹⁰³ BINET, Op. cit., p. 207-213

¹⁰⁴ Ibid, p. 207-213

¹⁰⁵ CHAUDHRY, Op. cit., p. 34-48

Así mismo, se observa un aumento del número de bacterias capaces de degradar los HAP a medida que nos acercamos a las raíces de la planta. Paralelamente, la biodegradación de los contaminantes aumenta o disminuye según la distancia dentro de la zona de influencia de los exudados; Corgie, et al. (2003)¹⁰⁶ constatan que hay una disminución de 86% a 36% de los compuestos aromáticos entre 0-3mm y 6-9mm de distancia de la raíz respectivamente.

La habilidad de la planta de estimular y degradar los contaminantes en el suelo depende también de la longitud y masa de las raíces. La profundidad efectiva para la fitorremediación de suelos contaminados comprende generalmente entre los "0.5 a 1 metro de la superficie"¹⁰⁷. Una alternativa consiste en inducir la proliferación de las raíces, y así la fitorremediación (la zona de influencia de las plantas aumenta).

Así la degradación de los HAP por las plantas no es muy importante, emplear especies vegetales en las técnicas de biodegradación es cada vez más utilizado; ellas aumentan la velocidad, la cantidad y el área de influencia de la degradación de los compuestos aromáticos.

Generalmente, las técnicas de biorremediación pueden ser menos rápidas que las metodologías físicas o químicas (sobretudo con la utilización estricta de plantas), pero son alternativas potencialmente utilizables a largo plazo para la biorremediación *In Situ* de suelos contaminados y un medio posible para valorizar económicamente los terrenos industriales abandonados. Además, dichas metodologías se consideran como estrategias menos costosas y menos severas con el ambiente.

Se puede entonces concluir que antes de aplicar un método de biorremediación es necesario tener en cuenta no sólo las características específicas de los contaminantes, sino también las condiciones a las cuales estos serán sometidos y las particularidades del terreno estudiado, al igual que los diferentes organismos presentes en el lugar y sus relaciones con otros organismos superiores.

¹⁰⁶ CORGIE, C., JONER, E.J. y LEYVAL, C. Rhizospheric degradation of phenanthrene is a function of proximity to roots. *En: Plant Soil*. Vol. 257, No. 1 (2003); p. 143-150.

¹⁰⁷ CHAUDHRY, Op. cit., p. 34-48

5.5.3 Marco legal de los HAP. Debido al reciente interés por el estudio de la afectación de suelos por hidrocarburos, la legislación pertinente a la contaminación de suelos y manejo de residuos peligrosos aún es escasa. Es de notar que en Colombia no se cuenta con legislación que determine los límites permisibles para este tipo de hidrocarburos en el suelo, el aire o el agua¹⁰⁸.

Sin embargo, la Procuraduría Federal de Protección al Ambiente (PROFEPA) en México recurre a las referencias de organismos internacionales en lo que concierne a los límites permisibles para HAP (Tabla 6).

Tabla 6. Límites permisibles para HAP's establecido por Canadá y los Países Bajos y Criterios de limpieza desarrollados por la PROFEPA

| Fuente | Parámetro | Suelo 1 (mgkg ⁻¹) | Suelo 2 (mgkg ⁻¹) | Suelo 3 (mgkg ⁻¹) | Agua (µg L ⁻¹) |
|--------------|-------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|
| Profepa | HTP | 1000 | 1000 | 2000 | --- |
| | Benzo(a)pireno | 0.08 | 0.08 | 0.75 | --- |
| | Benzo(a)antraceno | 0.8 | 0.8 | 7.5 | --- |
| | Benzo(b)fluoranteno | 0.8 | 0.8 | 7.5 | --- |
| | Benzo(k)fluoranteno | 8.0 | 8.0 | 75 | --- |
| | Criseno | 80 | 80 | 750 | --- |
| Canadá | Benzo(a)antraceno | 0.1 | 1.0 | 10.0 | 0.01 |
| | Benzo(a)pireno | 0.1 | 1.0 | 10.0 | 0.01 |
| | Benzo(a)fluoranteno | 0.1 | 1.0 | 10.0 | 0.01 |
| | Benzo(b)fluoranteno | 0.1 | 1.0 | 10.0 | --- |
| | Dibenzo(a,h)antraceno | 0.1 | 1.0 | 10.0 | 0.01 |
| | Indeno(1,2,3-cd)pireno | 0.1 | 1.0 | 10.0 | 0.01 |
| | Naftaleno | 0.1 | 5.0 | 50.0 | 0.1 |
| | Fenantreno | 0.1 | 5.0 | 50.0 | 0.2 |
| | Pireno | 0.1 | 10.0 | 100.0 | 0.2 |
| Países Bajos | Naftaleno | 5 | | | 7.0 |
| | Fenantreno | 10 | | | 2.0 |
| | Antraceno | 10 | | | 2.0 |
| | Fluoranteno | 10 | | | 1.0 |
| | Criseno | 5 | | | 0.5 |
| | Benzo(a)antraceno | 5 | | | 0.5 |
| | Benzo(a)pireno | 1 | | | 0.2 |
| | Benzo(k)fluoranteno | 5 | | | 0.5 |
| | Indeno(1,2,3-c,d)pireno | 5 | | | 0.5 |
| | Benzo(g,h,i)perileno | 10 | | | 1.0 |
| | HPA total | 20 | | | 10 |

Fuente: ORTIZ, R. Aspectos en la contaminación del suelo por hidrocarburos en México [en línea]. [Monografias.com](http://www.monografias.com/trabajos7/hime/hime2.shtml): 1997 [consultado 22 de Marzo de 2006]. Disponible en Internet: <http://www.monografias.com/trabajos7/hime/hime2.shtml>

Suelo 1: Se refiere a uso agrícola. Suelo 2: De uso residencial/recreativo. Suelo 3: De uso industrial

¹⁰⁸ MINISTERIO DE MINAS Y ENERGÍA DE COLOMBIA. Hidrocarburos [en línea]. Bogotá: 2006 [consultado 20 de Marzo de 2006]. Disponible en Internet: <http://www.minminas.gov.co/minminas/pagesweb.nsf?opendatabase>

Igualmente, en Ecuador se han establecido unos límites permisibles máximos para las concentraciones de algunos de los compuestos orgánicos pertenecientes a este tipo de hidrocarburos en lo que concierne a agua de consumo humano y uso doméstico (Tabla 7).

Tabla 7. Límites máximos permisibles para aguas de consumo humano y uso doméstico

| PARÁMETRO | Límite máximo permisible Que únicamente requiere tratamiento convencional (µg/L) | Límite máximo permisible que únicamente requiere desinfección (mg/L) |
|-------------------|---|---|
| Benceno | 10,0 | 0,01 |
| Benzo(a) pireno | 0,01 | 0,00001 |
| Etilbenceno | 700 | - |
| Estireno | 100 | - |
| Tolueno | 1 000 | - |
| Xilenos (totales) | 10 000 | - |

Fuente: MINISTERIO DE AMBIENTE DE ECUADOR. Texto unificado de legislación secundaria del Ministerio de Ambiente [en línea]. Edición Especial No. 2 del Registro Oficial (Decreto Ejecutivo 3516): 31 de Marzo, 2003. [consultado 15 de Abril de 2006]. Disponible en Internet: <http://www.efficacitas.com/index.php?codigo=04LFSHJc3j>

5.6 LOS ELEMENTOS TRAZAS METÁLICOS (ETM)

5.6.1 Características generales de los ETM. Los elementos trazas en general hace alusión a todos los elementos inorgánicos (metales y metaloides) presentes normalmente en el suelo en pequeñas concentraciones, pero que pueden tener efectos potencialmente tóxicos sobre los organismos¹⁰⁹. En el presente documento se analizará solamente lo concerniente a los elementos trazas metálicos.

Se observa que sólo una fracción del contenido de elementos trazas metálicos en el suelo es disponible para los organismos: la totalidad de los metales en forma de iones libres y una parte de los iones en fase sólida (Figura 4).

¹⁰⁹ TARRADELLAS, Op. cit., p. 176.

Generalmente, los elementos metálicos se distribuyen en cuatro grupos según su movilidad dentro del sistema suelo-agua; los primeros tres grupos (los iones metálicos solubles, los que están débilmente absorbidos en el suelo y los que son secretados durante el crecimiento de la planta) contienen iones que pueden ser tomados por los organismos, es decir que son biodisponibles en el medio terrestre. El último grupo corresponde a los elementos metálicos que no son movilizados durante el periodo de crecimiento de las plantas¹¹⁰.

Se observa que la composición y propiedades del suelo determinan el comportamiento de los elementos trazas. La granulometría tiene una influencia sobre el movimiento y absorción de los ETM; Zang, et al. (2003)¹¹¹ concluyen que la cantidad de metales pesados ligados a las partículas aumenta con la disminución del tamaño de las partículas en el suelo.

En cuanto a la materia orgánica en el suelo, se constata que un alto contenido de dicha materia en forma insoluble puede afectar la absorción de elementos en traza efectuada por las plantas¹¹².

La presencia de metales pesados puede inhibir la absorción de elementos nutritivos mayores de las plantas. McGrath, et al. (1988)¹¹³ observaron que la fijación de nitrógeno por las plantas se reduce a la mitad en suelos contaminados con metales pesados (Zn: 334 mg/kg, Cu: 99 mg/kg, Ni: 27 mg/kg et Cd: 10 mg/kg). Sin embargo, un efecto antagonista puede presentarse; los iones fosfato (otro elemento mayor) pueden reducir la absorción y transporte de cadmio y zinc en las plantas, afectando posiblemente su desarrollo¹¹⁴.

Por otra parte, la temperatura puede tener también una influencia en la absorción de elementos trazas por los vegetales, presentándose un aumento de su actividad y por tanto un incremento de la cantidad de metal en la planta. En las experiencias

¹¹⁰ Ibid., p. 176.

¹¹¹ ZHANG, M.K., ET. AL. Phosphorus and heavy metal attachment and release in sandy soil aggregate fractions. En: Soil science society of america journal. Vol. 67 (2003); p. 1158-1167.

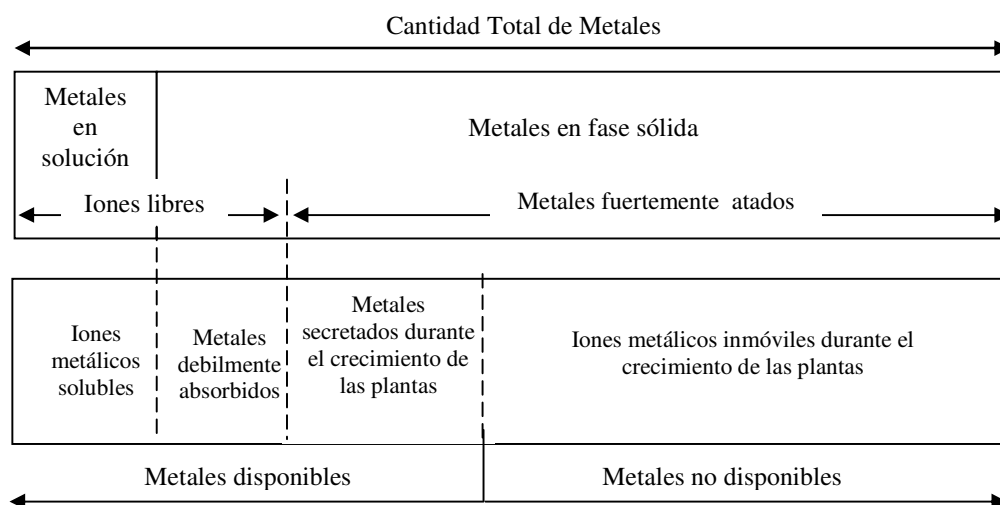
¹¹² TARRADELLAS, Op. cit., p. 176

¹¹³ MCGRATH S. P., ET AL. Effects of potentially toxic metals in soil derived from past applications of sewage sludge on nitrogen fixation by *Trifolium repens* L. En: Soil biology and biochemistry. Vol. 20, No. 4 (1988); p. 415-424.

¹¹⁴ TARRADELLAS, Op. cit., p. 176

de Kalembasa et al. (2004)¹¹⁵ se observa que en los meses de agosto se presenta una mayor concentración de cadmio en las plantas, y en algunos casos sucede igual con las concentraciones de plomo.

Figura 4. Modelo de la disponibilidad de los ETM en el suelo



Fuente: TARRADELLAS, J., BITTON, G., y ROSSEL, D. Soil ecotoxicology. United States of America: Lewis Publishers (CRC Press), 1997. p. 176. ISBN: 1-56670-134-1.

Igualmente, el pH juega un rol importante en la biodisponibilidad de los elementos metálicos presentes en el suelo; en condiciones ácidas, la mayoría de los metales se encuentran en forma libre en el medio. En el caso del molibdeno se produce el efecto contrario, “su disponibilidad aumenta en condiciones de pH superiores a 7”¹¹⁶.

5.6.2 Deficiencia y toxicidad de los ETM. Los primeros estudios acerca de la deficiencia y toxicidad de los elementos trazas metálicos se orientaban hacia la importancia de los micronutrientes para el desarrollo de las plantas, y las

¹¹⁵ KALEMBASA, D., ET. AL. The changes of the cadmium and lead content of the biomass *Miscanthus* grass depending upon the clones and term of sampling. Cracow (Poland): Proceeding of the international conference of bioremediation of soil and groundwater, 2004. p. 149-153.

¹¹⁶ BRADY, N.C, y WEIL, R.R. The nature and properties of soils. Editions N°13. United States of America: Pearson Education Inc., 2002. p. 960. ISBN 0-13-016763-0.

consecuencias de su deficiencia en el suelo. En efecto, las plantas utilizan no solo el nitrógeno, el fósforo y el potasio (elementos mayores) sino elementos trazas metálicos.

Se considera que el Cobre (Cu) activa varias enzimas que intervienen en los procesos de respiración y crecimiento en las plantas; también participa en las reacciones de oxidorreducción y para la formación de diferentes aminoácidos y proteínas. Según Salinas, et al. (1981)¹¹⁷, el cobre se localiza generalmente en los cloroplastos, donde interviene en la formación de la clorofila; una deficiencia de este elemento metálico puede generar la decoloración de las hojas (clorosis) principalmente para las hojas jóvenes.

Una deficiencia en Zinc (Zn) puede alterar el crecimiento de los tejidos de la planta. En efecto, este metal es indispensable para la síntesis de ácido indolacético, una sustancia reguladora del crecimiento y de las oxinas¹¹⁸.

Arduini, et al. (2004)¹¹⁹ opinan que las concentraciones de los elementos trazas en los suelos se agravan con la utilización de fertilizantes y abonos, las emisiones atmosféricas (depósitos de partículas a corto y largo plazo), las aguas servidas y los lodos industriales.

A menudo, un aumento en el contenido de elementos metálicos en el suelo genera una absorción mas elevada en las plantas; se considera que los elementos metálicos se incorporan en la cadena trófica por “bioacumulación”¹²⁰, provocando problemas para el medio ambiente, que pueden afectar finalmente al ser humano.

La ingestión de alimentos que contienen una importante cantidad de elementos pesados puede ocasionar afectaciones sobre el ser humano; Menke, et al.

¹¹⁷ SALINAS, J.G., SANZ, J.I., VALENCIA, C.A., y FUENTES DE PIEDRAHITA, C.L. Guía de estudio: Síntomas de deficiencia de micronutrientes y de toxicidades minerales en pastos tropicales. Colombia, Cali: CIAT, 1981. p. 5. Serie 04SP-02-02

¹¹⁸ Ibid., p. 9

¹¹⁹ ARDUINI, I., MASONI, A., MARIOTTI, M., y ERCOLI, L. Low cadmium application increase miscanthus growth and cadmium translocation. En: Environmental and experimental botany. Vol. 52 (2004); p. 89-100.

¹²⁰ MOHAMED, E. Z. y CHAMBON, C. Contribution à la définition d'une norme des sites pollués. Elaboration d'une méthodologie pour l'évaluation de la contamination d'un sol par éléments traces. Vandoeuvre-lès-Nancy, 1998. p. 196. Tesis Doctoral. Institut national polytechnique de Lorraine.

(2006)¹²¹ observan que un contenido de 0.48µmol/L aproximadamente de plomo (Pb) en la sangre de un adulto se asocia al aumento en el riesgo de mortalidad por enfermedad cardiovascular o cáncer. Pero las investigaciones de Yaman (2006)¹²² concernientes el aumento de los contenidos en metales pesados en los tejidos de los pacientes enfermos de cáncer muestran que la información existente sobre el tema es contradictoria y limitada.

En lo que concierne al Níquel (Ni), se encuentra en pequeñas cantidades en el ambiente, pero es utilizado por el humano en muchas aplicaciones, entre las que se destaca la producción de acero y otros productos metálicos. Este elemento es ingerido a través de alimentos como los chocolates y las grasas, o vegetales que hayan sido cultivados en suelos contaminados; además, el contacto de la piel con suelo contaminado por níquel o agua puede también resultar en la exposición al níquel. En muy altas cantidades el níquel puede provocar elevadas probabilidades de desarrollar “cáncer de pulmón, nariz, laringe y próstata; enfermedades y mareos después de una exposición al gas de níquel; embolia de pulmón; fallos respiratorios; defectos de nacimiento; asma y bronquitis crónica; reacciones alérgicas en la piel (por las joyas); desordenes del corazón”¹²³.

5.6.3 Biorremediación de los suelos contaminados con ETM. A diferencia de los contaminantes orgánicos, los elementos trazas metálicos no pueden ser degradados químicamente, pero su toxicidad en el suelo puede ser atenuada a través de procesos naturales que conllevan a su inmovilización o a la disminución de su biodisponibilidad. En efecto, diferentes componentes de los suelos como: el contenido de materia orgánica, los microorganismos y los vegetales, juegan un rol importante sobre el destino de los ETM en el ambiente¹²⁴.

¹²¹ MENKE, A., ET AL. Blood lead below 0.48 micromol/L (10 microg/dL) and mortality among US adults. En: Circulation. Vol. 114, No.13 (2006); p. 1388-1394.

¹²² YAMAN, M. Comprehensive comparison of trace metal concentrations in cancerous and non-cancerous human tissues. En: Current medicinal chemistry. Vol. 13, No. 21 (2006); p. 2513-2525.

¹²³ LENNTECH. Propiedades químicas del níquel, efectos del níquel sobre la salud humana, efectos ambientales del níquel [en línea]. Holanda: Lenntech agua residual & purificación del aire Holding B.V., 2005. [consultado 17 de Octubre de 2006]. Disponible en Internet: <http://www.lenntech.com/espanol/tabla-periodica/Ni.htm>

¹²⁴ LASON, B., MANCEAU, A., MARCUS, M., JAILLARD, B., HINSINGER, P., NITSCHKE, S., y BARONNET, A.. Immobilisation du zinc dans la rhizosphère de végétaux métallo-tolérants : Caractérisation structurale des phases nano-cristallines néoformées [en línea]. France: Institute National des Sciences de l'Univers (INSU-CNRS), 2006. [consultado 15 de Octubre de 2006]. Disponible en Internet: <http://www.insu.cnrs.fr/web/article/art.php?art=1759>

La movilidad de los elementos trazas puede ser promovida por la actividad de los microorganismos presentes en el suelo. Durante el crecimiento de las plantas se presenta un flujo de agua y disoluciones en la superficie de las raíces y sus proximidades; aquí, los iones o los compuestos orgánicos son también secretados en el medio. Por otro lado, la actividad de los microorganismos que habitan la rizósfera conlleva a la producción de agentes del complejo extracelular. Todo esto puede generar cambios en las condiciones físico-químicas del suelo rizosférico (pH, potencial de oxidorreducción, etc), y por consecuente de la composición en minerales, un cambio en el estado de los metales (disolución o precipitación de los minerales, adsorción, desorción, entre otros), y finalmente la incorporación de dichos elementos en las plantas¹²⁵.

Los estudios de Kozdroj, et al.¹²⁶ muestran que los exudados de las raíces generan la movilización de varios metales en el suelo. Esto puede estimular el desarrollo de comunidades bacterianas resistentes a dichos metales pesados, pero disminuyendo simultáneamente la diversidad microbiana a nivel rizosférico. Ellos consideran que esta situación puede beneficiar la fitorremediación debido a la movilización de los metales y la reducción de la biodisponibilidad de metales que podrían ser tóxicos para la planta.

Según Tarradellas et al.¹²⁷, algunas plantas tienen la capacidad de resistir a condiciones de estrés por metales pesados, o bioacumular dichos elementos en sus organismos. Se considera que las plantas hiperacumuladoras pueden retener en sus tejidos entre 1% y 25% de metal en materia seca vegetal.

5.6.4 Marco legal de los ETM. El contenido de metales pesados en el suelo varía de acuerdo al país y a los diferentes autores que han realizado sus estudios en el tema.

La tabla 8 presentada a continuación algunos los valores propuestos para el contenido de plomo (Pb), zinc (Zn), cadmio (Cd), cobre (Cu), cromo (Cr) y níquel (Ni) en los suelos.

¹²⁵ Ibid., <http://www.insu.cnrs.fr/web/article/art.php?art=1759>

¹²⁶ KOZDROJ, J. y DIRK VAN ELSAS, J. Response of the bacterial community to root exudates in soil polluted with heavy metals assessed by molecular and cultural approaches. *En: Soil biology and biochemistry*. Vol. 32 (2000); p. 1405-1417.

¹²⁷ TARRADELLAS, Op. cit., p.176.

Tabla 8. Criterios de calidad con respecto al contenido de metales pesados del suelo ($\mu\text{g.g}^{-1}$ suelo)

| Referencia | Pb | Zn | Cd | Cu | Cr | Ni |
|---|---------|--------|------|------|-------|-------|
| ICRLC Guidance note 59/83,(1987) | 500 | 300 | 3 | 130 | 600 | 70 |
| Netherlands: valores debajo de los cuales los suelos están probablemente no contaminados. Cairney, (1995) | 50 | 200 | 1 | 50 | 100 | 50 |
| © normal en suelos. Bowie y Thornton, (1985) | 10-150 | 25-200 | 1-2 | 2-60 | | 2-100 |
| Rango usual en suelos. Blum, (1995) | 0,1-150 | 25-200 | 0,5 | 2-60 | 5-100 | 2-100 |
| Mediana en suelos. Riffaldi y Levi, (1991) | 35 | 90 | 0,35 | 30 | 70 | 50 |
| Suelos no contaminados. Kabata-Pendias, (1992) | 70 | 50 | 1 | 40 | | 100 |
| Media en corteza terrestre. Sauerbeck, (1992) | 16 | 50 | 0,5 | 100 | 200 | 80 |
| Argentina. Decreto Reglamentario 831/93 de la Ley 24051 sobre régimen de desechos peligrosos. Niveles guía de calidad de suelos | 375 | 600 | 3 | 150 | 750 | 150 |
| Valor óptimo en sedimentos, nueva lista holandesa, (2003) | 85 | 140 | 0.8 | 36 | 100 | 35 |

Fuente: GIUFFRÉ, L., ET AL. Riesgo por metales pesados en horticultura urbana. En: Cienc. Suelo. Vol. 23, No. 1 (jan-jul. 2005); p.101-106.

5.7 *MISCANTHUS X GIGANTEUS* (MxG)

5.7.1 Orígenes y características generales de MxG. *Miscanthus x giganteus* es una planta perenne originaria de Asia del Este, nativa de China, Japón, Corea y Rusia del Este¹²⁸. Hace parte de la familia de las Gramínea (*Poaceae*), subfamilia *Andropogoneae* y de género *Miscanthus*¹²⁹; MxG proviene del cruce entre *Miscanthus sacchariflorus* y *Miscanthus sinensis*¹³⁰.

¹²⁸ JONES, L. RHS Plant trials and awards: *Miscanthus*. En: Royal horticultural society. Bulletin number 7 (2004); p. 3-5.

¹²⁹ HODKINSON, T., CHASE, M., y RENVOIZE, S. Characterization of a genetic resource collection for *Miscanthus* (Saccharinae, Andropogoneae, Poaceae) using AFLP and ISSR PCR. En: Annals of Botany. Vol. 89 (2002); p. 627-636.

¹³⁰ HODKINSON, T., y RENVOIZE, S. Nomenclature of *Miscanthus x giganteus*. En: Kew Bulletin (Norwich). Vol. 56, No. 3 (2001); p. 759.

Scurlock¹³¹, comenta que aparentemente, esta gramínea fue introducida por primera vez a Europa (específicamente Dinamarca) en 1935, y los ejemplares provenían de Yokohama (Japón).

Hodkinson, et al. (2002)¹³², Voigt, et al. (2005)¹³³ y Scurlock¹³⁴, coinciden en que *Miscanthus x giganteus* se caracteriza por ser una planta estéril triploide ($3x = 57$), cuya propagación se realiza a través de rizomas (sus semillas no son viables para reproducción sexual). *MxG* puede vivir aproximadamente 20 años y puede alcanzar hasta los 4 metros de altura.

De las características descritas hasta el momento se puede mencionar que sus culmos son erectos y pueden alcanzar un diámetro entre 5 y 10 mm; su tallo contiene nodos pubescentes. Otras características son la presencia de hojas caulinares¹³⁵.

Miscanthus x giganteus presenta una fuerte resistencia a las bajas temperaturas, lo que explica su tolerancia a los periodos invernales; su sistema de rizomas puede resistir temperaturas de hasta 5°C. Por otro lado, esta gramínea no aprecia la presencia de agua estancada ni la acumulación prolongada de la misma; sin embargo, *MxG* puede verse afectada en caso de “estrés hídrico”¹³⁶ (la irrigación puede influenciar el porcentaje de supervivencia de la planta durante el primer año).

Por otro lado, *Miscanthus x giganteus* es una planta de tipo C4, es decir que presenta una extrema eficacia en la utilización de energía a nivel de la fotosíntesis; no presenta una estabilización en la asimilación del carbono con el aumento de la radiación solar (como es el caso de las plantas C3). Esta característica se

¹³¹ SCURLOCK, J. M. O. *Miscanthus*: Review of European experience with a novel energy crop. U.S.A: Oak Ridge National Laboratory, Environmental Sciences Division Publication No. 4845, February 1999. p. 57.

¹³² HODKINSON, Op. cit., p. 627-636

¹³³ VOIGT, T., y PYTER, R. *Miscanthus X Giganteus* Propagation Studies [en línea]. United States, Illinois : Convention Center, Exhibit Hall ABC, 8 Nov., 2005, [consultado 10 de septiembre de 2006]. Disponible en Internet : <http://crops.confex.com/crop/2005am/techprogram/P6643.htm>.

¹³⁴ SCURLOCK, Op. cit., p. 57

¹³⁵ HODKINSON, Op. cit., p. 759.

¹³⁶ NAIDU, S., AL-SHOABI, A. y LONG, S.P. Cold tolerance of C4 photosynthesis in *Miscanthus x giganteus*. Queensland, Australia: PS2001, Proceedings of the 12th International Congress on Photosynthesis, Brisbane Convention & Exhibition Centre, August 18-23, 2001. p. 153.

presenta generalmente para las plantas tropicales y subtropicales¹³⁷. Sin embargo, las investigaciones efectuadas por Naidu, et al. (2003¹³⁸, 2004¹³⁹) muestran que *MxG* tienen una buena actividad fotosintética en los climas templados, así como en la producción de biomasa; Scurlock¹⁴⁰ recalca además que esta planta se adapta mejor a temperaturas bajas que otras plantas del mismo tipo (C4).

Se observa que Hodkinson, et al.¹⁴¹ consideran que *Miscanthus x giganteus* es incorrectamente conocida como *M. giganteus* o *M. sinensis* 'Giganteus', y a menudo confundida con *Miscanthus sacchariflorus*.

5.7.2 Utilización de *MxG*. Según Scurlock (1999)¹⁴² *Miscanthus x giganteus* fue cultivada en Europa en los años 1930 como planta ornamental, junto con otras variedades de *Miscanthus*. Posteriormente, en 1960 se comenzaron a adelantar los estudios sobre el potencial de producción de fibra de celulosa de esta gramínea, siendo los dinamarqueses quienes debutaron las pruebas para la fabricación de bioenergía en 1983; esta nueva alternativa fue descartada en Alemania (1983) antes de realizar una evaluación más extendida en el conjunto de la Unión Europea.

Kalembasa, et al.¹⁴³, comentan que los estudios concernientes a los métodos de establecimiento de cultivo de *MxG* a bajo costo tienen lugar a partir de los años 90, con la utilización de esta gramínea para la producción de biocombustibles (es decir, una alternativa de energía renovable), la fabricación de materiales de construcción o para la alimentación de ganado (forraje).

¹³⁷ SCURLOCK, Op. cit., p. 57

¹³⁸ NAIDU, S.L., MOSSE, S.P., AL-SHOAIBI, A.K., RAINES, C.A. y LONG, S.P. Cold tolerance of C4 photosynthesis in *Miscanthus x giganteus*: adaptation in amounts and sequence of C4 photosynthetic enzymes. En: Plant physiology. Vol. 132, No. 3 (2003); p. 1688-1697.

¹³⁹ NAIDU, S.L., y LONG, S.P. Potential mechanisms of low-temperature tolerance of C4 photosynthesis in *Miscanthus x giganteus*: an in vivo analysis. En: Planta. Vol. 220, No. 1 (2004); p. 145-155.

¹⁴⁰ SCURLOCK, Op. cit., p. 57

¹⁴¹ HODKINSON, Op. cit., p. 627-636.

¹⁴² SCURLOCK, Op. cit., p. 57

¹⁴³ KALEMBASA, D., VANHOLD, N., y MALINOWOSKA, E. The changes of the cadmium and lead content of the biomass *Miscanthusa* grass depending upon the clones and term of sampling. Cracow (Poland): Proceeding of the international conference of bioremediation of soil and growndwater, 2004. 149-153 p.

Se considera que en Europa bajo condiciones agrícolas típicas, y en grandes extensiones, un cultivo de *Miscanthus x giganteus* puede producir en promedio 8 toneladas por hectárea (correspondientes a 3 toneladas por acre de materia seca aproximadamente) por cada periodo de cosecha¹⁴⁴.

5.7.3 Importancia de *MxG* para la biorremediación de suelos. Hasta el momento no se ha realizado ningún estudio concerniente a la capacidad de *Miscanthus x giganteus* en la recuperación de suelos contaminados por hidrocarburos aromáticos policíclicos. Sin embargo, se constata que varios científicos se han interesado sobre la relación existente entre esta gramínea y los elementos trazas metálicos, principalmente para el caso del cadmio.

Las investigaciones sobre la acción del cadmio sobre *Miscanthus sinensis L. var giganteus* efectuados por Arduini, et al.¹⁴⁵ demuestran que cuando las concentraciones de cadmio son de 0,5mg/L, la biomasa de los tallos secundarios y raíces de la planta aumenta con cada cosecha (después de un mes y después de 3 meses de la puesta en marcha del cultivo de *MxG* en soluciones nutritivas contaminadas); en cambio, la biomasa del tallo principal aumentaba ligeramente en la primera cosecha y disminuía en la segunda. Por otro lado, si la concentración en cadmio aumentaba (0.75 mg/L) la biomasa de la parte aérea disminuía en las dos cosechas para todos los casos.

Se subraya además que la biomasa de *Miscanthus sinensis L. var giganteus* aumentaba con respecto a la de las plantas utilizadas como testigo en dichos experimentos, para las concentraciones de cadmio comprendidas entre 0.25 mg/L y 0.50 mg/L. La velocidad relativa de crecimiento de esta gramínea es estimulada principalmente durante el primer periodo (según los resultados obtenidos después del primer mes de cultivo), pero disminuye en el tiempo para el tallo principal y el rizoma¹⁴⁶.

Arduini, et al.¹⁴⁷ observan igualmente que la acumulación del cadmio en la planta crecía con el aumento de las concentraciones del metal en el medio de cultivo; al

¹⁴⁴ SCURLOCK, Op. cit., p. 57

¹⁴⁵ ARDUINI, I., MASONI, A., MARIOTTI, M., y ERCOLI, L. Low cadmium application increase miscanthus growth and cadmium translocation. En: Environmental and experimental botany. Vol. 52 (2004); p. 89-100.

¹⁴⁶ Ibid., p. 89-100

¹⁴⁷ Ibid., p. 89-100

comparar dichas acumulaciones en las diferentes partes de la planta se noto que éstas eran superiores a nivel de la raíz. Por otro lado, la cantidad de cadmio acumulada en la planta disminuye a medida que el tiempo de cultivo aumenta; es de resaltar que los resultados de Kalembasa, et al.¹⁴⁸ muestran que la acumulación de cadmio se limita con el transcurso del tiempo.

Según los experimentos de Arduini, et al.¹⁴⁹ los mejores trasferencias de cadmio hacia las hojas se observó para los individuos expuestos a concentraciones de 0.5 mg/L del metal en el medio (e inferiores para un contenido de 0.75 mg/L). Por otro lado, la acumulación en los nuevos brotes de la planta era menos importante; ellos consideran que el transporte interno de cadmio es limitado por los mecanismos naturales de la planta.

Finalmente, la morfología de las raíces (largo, volumen y superficie de contacto) puede verse afectada por concentraciones altas de cadmio en el medio. Sin embargo, así se presente una afectación en dichas variables, esto no afecta la masa seca total de las raíces.

En lo que concierne al plomo (Pb), las investigaciones llevadas a cabo por Kalembasa, et al.¹⁵⁰ muestran que la bioacumulación de *Miscanthus sinensis x giganteus* es mas importante que la de *Miscanthus sinensis*, con 1.93 mg/kg y 1.56 mg/kg (en material seco) respectivamente. Ellos observan también que la acumulación de plomo aumenta con el tiempo de exposición de la planta (0.87 mg/kg para el mes de junio y 2.09 mg/kg para el mes de octubre).

¹⁴⁸ KALEMBASA, Op. cit., p. 149-153

¹⁴⁹ ARDUINI, Op. cit., p. 89-100

¹⁵⁰ KALEMBASA, Op. cit., p. 149-153

6. DISEÑO METODOLÓGICO

6.1 METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

El proyecto de investigación siguió el esquema del estudio experimental, el cual buscaba establecer la influencia de un factor o varios factores que condicionan una situación específica¹⁵¹.

De acuerdo a los diferentes tipo de diseño experimental descritos por los autores, esta investigación se podría catalogar como una comparación estadística de grupo, la cual es utilizada para determinar la influencia de una variable en un grupo (grupo experimental) y no sobre otro (grupo de control, o testigo). Las conclusiones se alcanzan al comparar el comportamiento de cada grupo para determinar los efectos de la variable en uno de ellos¹⁵².

6.2 MATERIALES Y MÉTODOS

6.2.1 Material bacteriológico. Las bacterias utilizadas para la realización de los experimentos presentaban orígenes muy diferentes; sin embargo, todos los tratamientos a los cuales estuvieron sometidas fueron estrictamente controlados en laboratorio.

A continuación se describen los dos grupos de bacterias utilizados para los experimentos; ambos grupos fueron inoculados en forma de solución en agua fisiológica. Todas las manipulaciones estuvieron dirigidas por el Dr. Pagnoux y llevadas a cabo en compañía de la estudiante de doctorado Cathy Gruber.

♦ *Mycobacterium spn 11*. Es una bacteria parcialmente identificada y estudiada por el Dr. C. Pagnoux; se considera específica de la degradación de pireno. Dos metodologías fueron utilizadas para la identificación de esta bacteria:

¹⁵¹ BROWN, J.D. Doing second language research. Oxford : Oxford University Press, 2002. XIV. p. 231-235: il. (Oxford Handbook for language teachers). 0-19-437174-3.

¹⁵² Ibid., p. 232.

electroforesis en gel con gradiente de temperatura (TGGE) y a través de la identificación por ARN 16s.

♦ Asociación de 6 colonias diferentes de bacterianas. A partir de sedimentos provenientes de un curso de agua altamente contaminado por hidrocarburos aromáticos policíclicos fueron escogidas 6 colonias de bacterias; dichas colonias fueron seleccionadas por presión sobre pireno en un medio nutritivo. Sin embargo aún se encuentran parcialmente identificadas.

6.2.2 Material vegetal: *Miscanthus x giganteus*. Para los experimentos se utilizaron rizomas de *Miscanthus x giganteus*, los cuales fueron proporcionados por el Lycée Agricole de Courcelles Chaussy.

Los rizomas fueron limpiados y luego clasificados cuidadosamente en 3 grupos diferentes, teniendo en cuenta la apariencia del rizoma y la presencia y estado de los brotes observados:

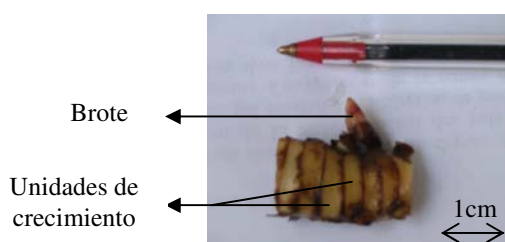
- Rizomas aptos para el cultivo. Los rizomas que presentaban brotes, preferiblemente de 0.5 cm a 1.5 cm de longitud, fueron clasificados en el primer grupo.
- Rizomas con brotes potenciales. El segundo grupo lo conformaba rizomas que mostraban pequeños brotes, o rizomas sin brotes pero con posibilidades para el desarrollo de nuevos brotes (brotes aparentes).
- Rizomas irregulares. Estos rizomas tenían un sistema muy complejo, donde los brotes no eran evidentes o donde los brotes eran difíciles de separar; este grupo no fue incluido en la selección de rizomas para los experimentos.

Durante un periodo de aproximadamente 1 mes, los rizomas del primer y segundo grupo fueron puestos en una estufa fitotrónica CONVIRON CMP4030, programada a una temperatura de 18 °C, una humedad de 80 % y una luminosidad de

5 horas/día¹⁵³. Las condiciones recreadas en la estufa permitieron conservar los rizomas, promoviendo simultáneamente su crecimiento y desarrollo).

Antes de poner en marcha los experimentos, los rizomas fueron sacados de la estufa para ser nuevamente seleccionados, separando los rizomas preferiblemente homogéneos (de brotes 0.5 cm a 1.5 cm); luego los brotes fueron seccionados del rizoma conservando como mínimo dos unidades de crecimiento a cada lado del brote (Fotografía 2).

Fotografía 2. Prototipo ideal de brote de *MxG* para los experimentos



6.2.3 Suelos Standard estériles. Para el establecimiento de los experimentos se utilizó un suelo Standard estéril, el cual fue encargado a la empresa alemana LANDWIRTSCHAFTLICHE UNTERSUCHUNGS-UND FORSCHUNGSANSTALT (LUFA).

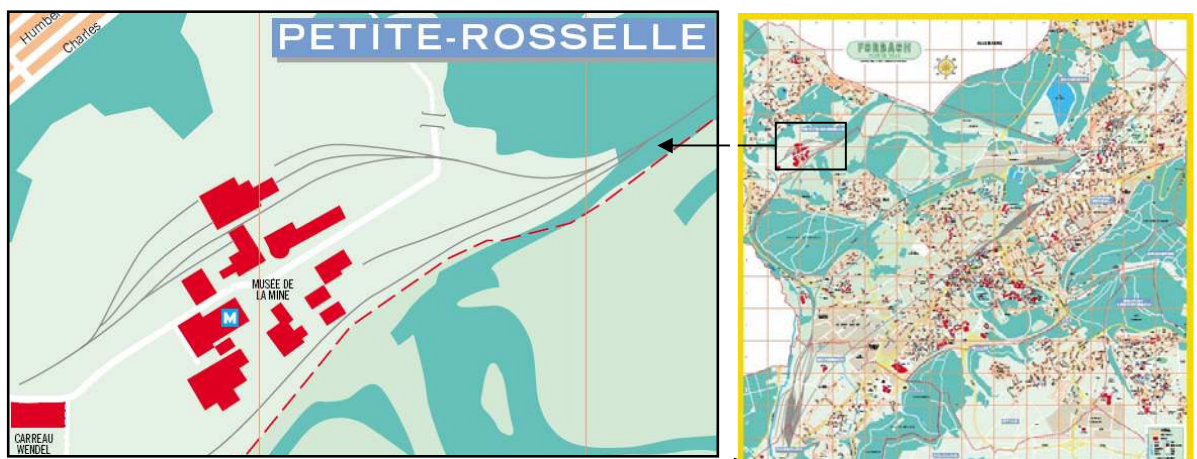
Los 250 kg de suelo correspondían a un suelo Standard de tipo A3, cuyas características se presentan en el anexo B. El utilizar estos suelos permitió a los investigadores controlar en lo posible la mayoría de las condiciones experimentales en laboratorio puesto que se conocían con certeza sus características específicas, además de adecuar otras características nuevas al suelo (como lo fue la cantidad de contaminantes y material orgánico).

¹⁵³ ENTREVISTA con Philippe Arnoux, Ingeniero de Estudios del Equipo Técnico del I.U.T. de Thionville/Yutz. Yutz, 30 de Agosto de 2006.

6.2.4 Suelos del Carreau Wendel - Vuillemin. Para el establecimiento de los experimentos también se utilizó el suelo proveniente de la antigua mina de carbón Carreau Wendel.

♦ El Carreau Wendel - Vuillemin. Fue industria pesada de los siglos XIX y XX, se encuentra situada sobre los territorios de la Petite-Rosselle, en el departamento de la Moselle (Lorraine, France), a proximidades de la ciudad de Forbach (Figura 5).

Figura 5. Ubicación geográfica de la mina de carbón Carreau Wendel-Vuillemin



Fuente: MAIRIE DE FORBACH. Plan de la Ville [en línea]. France, Forbach : 2006. [consultado 15 Junio de 2006]. Disponible en Internet : <http://www.mairie-forbach.fr/Forbach.pdf>

La descripción de la actividad minera de este lugar se presenta en el anexo C.

♦ Caracterización de los suelos de la mina Carreau Wendel. A continuación se presentan los métodos utilizados para la recolección, preparación y análisis de los suelos del Carreau Wendel utilizados para los experimentos.

- Muestreo de los suelos de la mina Carreau Wendel. Para la recolección de las muestras de suelo se siguieron los parámetros establecidos en la norma francesa X 31-100¹⁵⁴.

Así pues, se delimitó una parcela representativa, teniendo en cuenta que el terreno fuera lo más homogéneo posible; para ello se observaron factores como el color, el aspecto y presencia de vegetación, el relieve, entre otros. Aquí, 16 muestras elementales de suelo fueron recolectadas de manera aleatoria, a una profundidad de 15 cm aproximadamente. Se constata que el suelo presentaba un horizonte único (no se observó una estratificación de los horizontes en el perfil del suelo).

Es de notar que la vegetación del lugar estaba compuesta principalmente de gramíneas o rastreras, y algunas especies vegetales colonizadoras; también se observaban lugares donde la vegetación era ausente, resultado de la actividad realizada en el lugar anteriormente (Fotografía 3).

Fotografía 3. Vegetación y vestigios del Carreau Wendel



Finalmente las muestras elementales fueron puestas en un recipiente suficientemente grande, para ser homogeneizadas y así constituir una muestra global.

¹⁵⁴ ASSOCIATION FRANÇAISE DE NORMALISATION (AFNOR). Qualité des sols – Échantillonnage. Norme X 31-100, 1992. p. 8.

Ficha técnica de la muestra global de suelo:

- **Realizadores del muestreo:** Equipo de Inmunología-microbiología
- **Dirección de los realizadores del muestreo:** Impasse Kastler 57970 Yutz
- **Apellidos de los recolectores de las muestras:** Morloth, Gruber, Martínez
- **Fecha de los muestreos:** 25 de Abril de 2006 y 17 de Mayo de 2006
- **Región:** Lorraine
- **Departamento:** Moselle
- **Lugar:** Museo de la Mina – Carreau Wendel, 57540 Petite Rosselle

- Pretratamiento de los suelos de la mina Carreau Wendel para análisis físico-químico. La muestra global de suelo fue preparada para su análisis físico-químico de acuerdo a la norma francesa NF ISO 11464, de diciembre de 1994¹⁵⁵.

Los suelos fueron extendidos en una mesa de laboratorio (a la sombra) para ser secados al aire ambiente por un periodo de 2 semanas, a una temperatura de 20°C aproximadamente (fotografía 4). Durante este tiempo, el suelo fue removido esporádicamente con la mano para facilitar el proceso de secado y para retirar las piedras de gran tamaño, los restos vegetales, entre otros.

Fotografía 4. Secado del suelo del Carreau Wendel



¹⁵⁵ ASSOCIATION FRANÇAISE DE NORMALISATION (AFNOR). Qualité des sols - Prétraitement des échantillons pour analyses physico-chimiques. Norme NF ISO 11464, 1994. p. 6.

Después del secado, las fracciones gruesas y finas fueron separadas por tamizado manual con ayuda de cernidores de 2mm; así pues, se obtuvieron 2 muestras globales de suelo clasificadas: fracción < 2mm y fracción >2mm. Cada una fue entonces pesada y su proporción ponderada fue calculada (con 5% de precisión) por medio de la formula a continuación¹⁵⁶:

$$\% \text{ ponderal} = \frac{\text{Peso de la fracción}}{\text{Peso total del suelo secado al aire}} * 100$$

- Preparación de la fracción de suelo < 2mm. Con un repartidor manual RETSCH TYP25 la totalidad de la fracción fue dividida en 2 partes. Enseguida, utilizando el aparato mecánico de submuestreo RETSCH PT100, programado a 45 revoluciones (para evitar la producción de polvo), una de las partes fue dividida en 8 frascos; el contenido de uno de estos fue repartido nuevamente con el mismo aparato, con el fin de obtener 8 submuestras finales de laboratorio homogéneas, de suelo a 2mm. (Figura 6)

- Preparación de la fracción de suelo > 2mm. Esta fracción fue dividida 4 veces con el repartidor mecánico RETSCH TYP25; tres submuestras finales de laboratorio, de suelo > 2mm, fueron preparadas. (Figura 6).

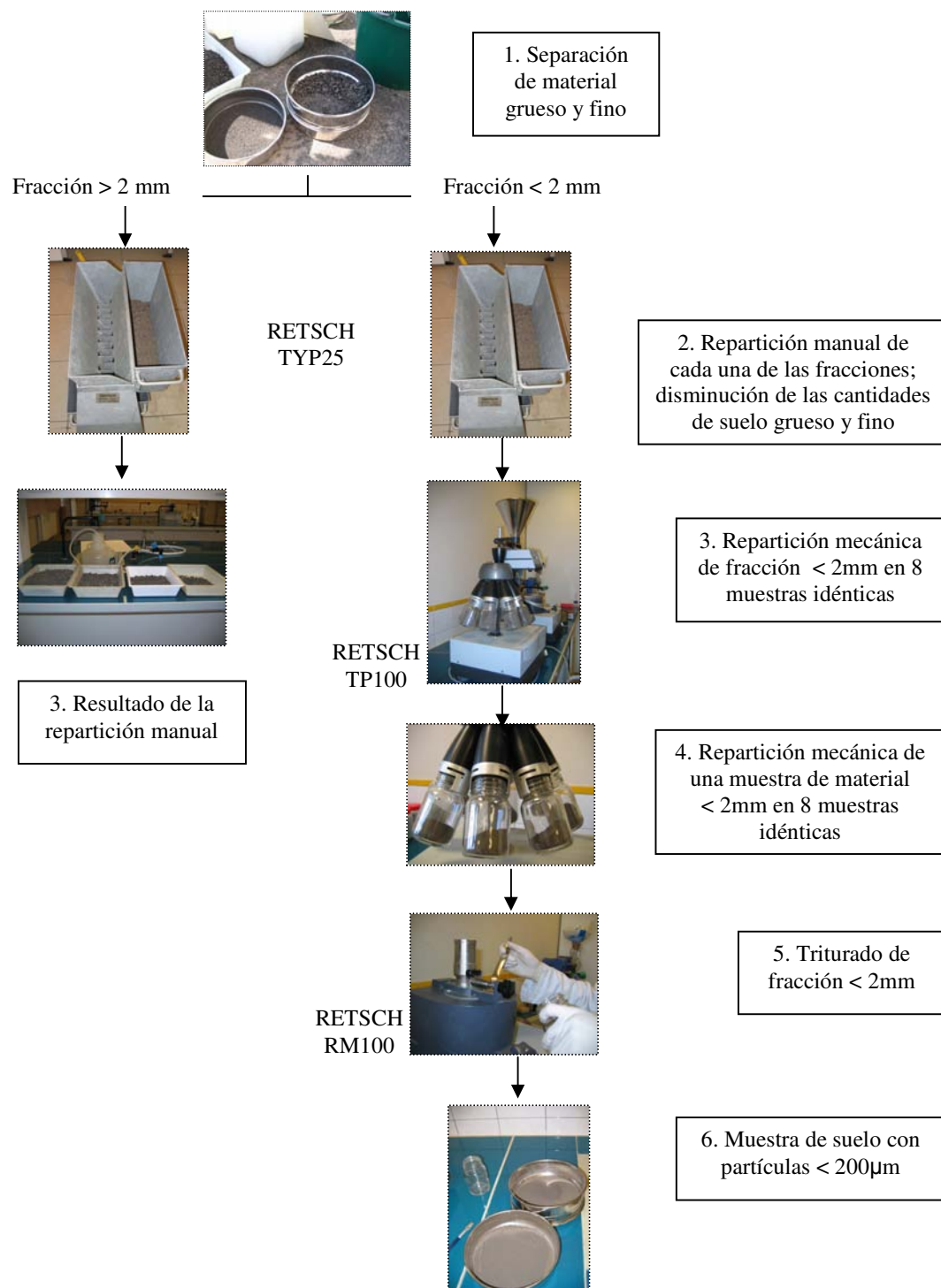
Por otro lado, una de las submuestras finales de laboratorio fue triturada y tamizada a 200µm (condiciones necesarias para algunos de los análisis físico-químicos de suelo); para ello se utilizó un triturador RETSCH RM 100. Se obtuvo entonces una submuestra final de laboratorio, de suelo a 200µm. (Figura 6)

- Determinación del pH del suelo de la mina Carreau Wendel. El pH fue determinado en una suspensión diluida 1:5 (V/V) de suelo en agua destilada (pH-H₂O) y en una solución de cloruro de potasio a 1mol/L (pH-HCl), según las indicaciones establecidas en la norma francesa NF ISO 10390 de noviembre de 1994¹⁵⁷.

¹⁵⁶ BAIZE, D. Guide des analyses en pédologie. Edition n°2. Paris : INRA Editions, 2000. p. 257. ISBN 2-7380-0892-5.

¹⁵⁷ ASSOCIATION FRANÇAISE DE NORMALISATION (AFNOR). Qualité des sols - Détermination du pH. Norme NF ISO 10390, 1994. p. 3.

Figura 6. Procedimiento e instrumentos para la separación inicial de suelos



En este análisis fueron utilizadas las muestras de suelo de la fracción < 2mm. En una probeta graduada de 5mL, 5mL equivalentes de suelo fueron medidos y puestos en contacto con 25 mL de agua destilada o cloruro de potasio (es decir, 5 veces el volumen de suelo empleado); se prepararon 3 réplicas en cada uno de los casos. Las replicas fueron agitadas durante 5 minutos con ayuda de un agitador rotativo Heidolph REAX 20, y puestas en reposo durante 2 horas.

Durante el periodo de reposo, el pHmetro METTLER TOLEDO MP220 fue calibrado con dos soluciones estándar de pH igual a 4 y a 7; para ello, el electrodo del pHmetro fue sumergido dentro de cada solución y los valores medidos fueron registrados en el aparato. Antes de las medidas de pH, cada muestra fue agitada energicamente; los valores fueron reportados después de que el pHmetro obtuvo un equilibrio.

- Determinación de la humedad y material seco del suelo de la mina Carreau Wendel. La metodología utilizada para este análisis se encuentra descrita en la norma francesa NF ISO 11465 de agosto de 1994¹⁵⁸.

Debido a la composición del suelo proveniente del Carreau Wendel, los análisis fueron realizados en triplicados para los 3 tipos de muestras de laboratorio obtenidas (fracciones < 200µm, < 2mm y > 2mm).

En primera instancia, recipientes en cerámicas (con sus respectivas tapas en aluminio) fueron secados en el horno MEMMERT Modell 800, a una temperatura aproximada de 105°C, con el fin de eliminar toda humedad presente. Al retirarlos del horno, se introdujeron en un desecador en vidrio durante 45 minutos, con el fin de enfriar los crisoles evitando la humedad ambiente. Se prosiguió entonces a medir el peso de cada uno de los recipientes cerrados (m_0 en gramos) con la ayuda de la balanza PRECISA XB 220A (de 10 mg de precisión).

Posteriormente, a cada recipiente se le agregaron aproximadamente 10 g de cada una de las fracciones de suelo y se cubrieron con su respectiva tapa; los recipientes fueron marcados según su contenido: replicas de la fracción > 2mm ($G_{1, 2 y 3}$), replicas de la fracción < 2mm ($S_{1, 2 y 3}$) y replicas de la fracción > 200µm

¹⁵⁸ ASSOCIATION FRANÇAISE DE NORMALISATION (AFNOR). Qualité des sols – Détermination de la teneur pondérale en matière sèche et en eau. Norme NF ISO 11465, 1994. p. 4.

(F_{1, 2 y 3}), luego se midió su peso (m₁ en gramos) y finalmente se introdujeron al horno a una temperatura de 105°C, hasta obtener una masa constante.

Luego, se retiraron las muestras del horno y se dejaron reposar durante 45 minutos en el desecador en vidrio; transcurrido ese tiempo, se determinó el peso (m₂ en gramos) de cada muestra.

El contenido de humedad (W_{H₂O}) y material seco (W_{dm}), expresados en porcentaje en masa presente en cada fracción de suelo, se determinó con ayuda de las siguientes ecuaciones (con una precisión de 0,1%):

$$W_{H_2O} = \frac{m_1 - m_2}{m_2 - m_0} \times 100 \quad W_{dm} = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \times 100$$

Donde,

m₀ masa, en gramos, del recipiente vacío con su cubierta
m₁ masa, en gramos, del recipiente con la fracción de suelo secada al aire
m₂ masa, en gramos, del recipiente con la fracción de suelo secada a 105°C

▪ Determinación del nitrógeno total en el suelo de la mina Carreau Wendel. Par determinar la cantidad total de nitrógeno contenido en el suelo, se aplicó el método Kjeldahl descrito en la norma francesa NF ISO 11261 de junio de 1995¹⁵⁹.

Para este análisis se prepararon 6 muestras: 1 blanco, 1 solución de verificación de sulfato de amonio* (1mL para la prueba), 1 solución de verificación de acetanilida** (1mL para la prueba), 1 suelo Standard (0.2g para la prueba) y 2 de suelo de mina (0.2g de fracción < 2mm para cada prueba).

¹⁵⁹ ASSOCIATION FRANÇAISE DE NORMALISATION (AFNOR). Qualité des sols – Dosage de l'azote total. Norme NF ISO 11261, 1995. p. 3.

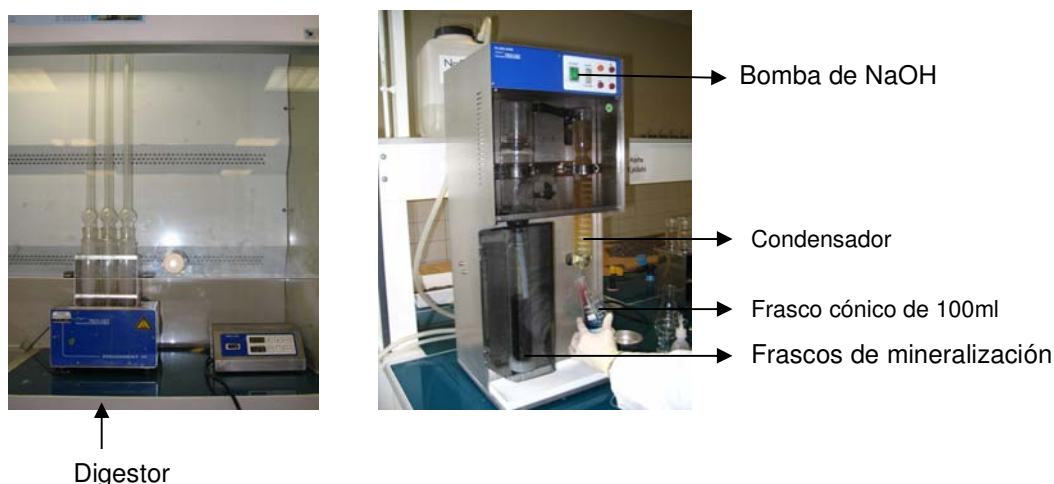
*Para la preparación de la solución de sulfato de amonio, 0.4724g de (NH₄)₂SO₄ fueron diluidos en 100mL de agua destilada.

** Para la preparación de la solución de acetanilida, 0.9659g de C₈H₉NO fueron diluidos en 100mL de agua destilada.

Cada muestra se colocó en un frasco de mineralización kjeldahl de 50mL, perfectamente identificados (blanco: B; sulfato de amonio; acetanilida; Suelo Standard: S_{1 y 2}; Suelo de mina: F_{1 y 2}) con 4mL de ácido salicílico/sulfúrico* ; los frascos fueron agitados y dejados en reposo. Luego, 0.5g de tiosulfato de sodio pentahidratado fueron agregados; las mezclas fueron calentadas durante una hora aumentando la temperatura de 5°C cada minuto hasta llegar a los 80°C.

Los frascos fueron enfriados de nuevo, y 1.1g de mezcla catalítica* fueron agregados. Después, las muestras fueron calentadas en una estufa Prodigest VI durante una hora y media, aumentando igualmente de 5°C cada minuto la temperatura hasta alcanzar los 150°C; luego la temperatura se elevó a los 300°C para dejar en ebullición durante una hora (con el mismo aumento paulatino de la temperatura). (Fotografía 5)

Fotografía 5. Instrumentos de mineralización y destilación para en análisis del nitrógeno total



Al día siguiente, las muestras fueron recalentadas durante dos horas aumentando la temperatura de 5°C cada minuto hasta alcanzar los 250°C; la mineralización

* Para la preparación de la combinación de ácido, 25g de ácido salicílico fueron disueltas en 1L de ácido sulfúrico concentrado ($[H_2SO_4] = 1.84g/cm^3$)

** Para la preparación de la mezcla, fueron triturados u combinados 200g de sulfato de potasio, 6g de sulfato de cobre pentahidratado y 6g de dióxido de titanio cuya estructura cristalina corresponde al anatase.

acaba cuando las primeras decoloraciones de las muestras aparecen. Después de enfriamiento, 20mL de agua destilada son agregados agitando las muestras.

Después de la instalación de los frascos para su destilación en el Kjeldis de PROLABO (fotografía 5), 10mL de ácido bórico ($\rho(\text{H}_3\text{BO}_3) = 20\text{g/L}$) fueron agregados dentro del frasco cónico de 100mL, puesto en la salida del condensador, de manera que el tubo de salida se encuentre sumergido en la solución. Luego 20mL de hidróxido de sodio ($[\text{NaOH}] = 10\text{mol/L}$) fueron inyectados con ayuda de la bomba del aparato; La destilación puede tener lugar ahora.

Después de haber recuperado aproximadamente 40mL de destilado, y obtenido un cambio de su coloración de azul oscuro a azul turquesa, se verifica el final de la destilación con ayuda de fenolftaleína (indicador de color).

Posteriormente, algunas gotas de indicador de color* fueron añadidas al destilado y la solución fue titulada con ácido sulfúrico ($[\text{H}_2\text{SO}_4] = 0.01\text{ mol/L}$) hasta el cambio de coloración a violeta; el volumen de ácido fue registrado.

Para determinar el contenido en nitrógeno (W_N en mg/g) se aplicó la formula presentada a continuación:

$$W_N = \frac{(V_1 - V_0) * c(\text{H}^+) * M_N}{m_p} * \frac{100 + W_{\text{H}_2\text{O}}}{100}$$

Donde,

| | |
|--------------------------|---|
| V_1 | Volumen, en ml, de ácido sulfúrico utilizado para la titulación de la muestra |
| V_0 | Volumen, en ml, de ácido sulfúrico utilizado para la muestra blanco |
| $c(\text{H}^+)$ | 0,02 mol/L |
| M_N | Peso molecular del nitrógeno en g/mol (14g/mol) |
| m_p | Masa de suelo secado al aire utilizada para la prueba, en g |
| $W_{\text{H}_2\text{O}}$ | Contenido ponderado de agua, expresado en porcentaje en masa (ISO 11465) |

* Para la preparación del indicador, 0.1g de verde de bromocresol y 0.02g de rojo de metal fueron disueltos en 100mL de etanol.

▪ Determinación del carbono orgánico en el suelo de la mina Carreau Wendel. Dos métodos fueron utilizados para determinar el contenido en carbono orgánico presentes en los suelos de la mina.

- Determinación de carbono orgánico: Metodo ANNE. El modo operatorio para la preparación de las muestras, toma de la muestra y la oxidación, siguieron las recomendaciones propuestas por la norma francesa NF X 31-109 de mayo de 1993, para la determinación de carbono orgánico por oxidación sulfocrómica¹⁶⁵. Sin embargo, la cantidad de este elemento fue establecida a través de una titulación con sal de Mohr, metodología inspirada del análisis de aguas (comunicación personal de Dominique Morlot, jefe del Departamento Genio en Biología I.U.T. Thionville/Yute, 19 de septiembre de 2006).

Para este análisis fueron preparadas 7 muestras: 1 blanco, 1 solución de verificación de glucosa* (1mL de solución para la prueba), 2 suelos Standard (0.5g de suelo para la prueba) y 3 suelos de mina (0.1g de la fracción <200µm para cada prueba).

Cada muestra fue puesta en un balón de 10mL previamente identificado (Blanco: B; Glucosa: G; Suelo Standard: S_{1, 2 y 3}; Suelo de mina: F_{1, 2 y 3}). Luego, 5mL de bicromato de potasio a 8%** y 7.5mL de ácido sulfúrico puro fueron adicionados, respetando el orden de los reactivos.

Las muestras fueron llevadas a ebullición lenta, ligadas a un refrigerante ascendente, por un periodo de 30 minutos. Los balones fueron retirados y su contenido fue puesto en frascos de 100mL, completando con agua destilada el volumen del frasco.; 10mL de la dilución fueron tomados y diluidos nuevamente en frascos de 100mL. Las muestras están listas para ser tituladas.

Cada muestra fue introducida en un beaker de 500mL, junto con 1g de fluoruro de sodio (FNa) y 5 gotas de difenilamina (indicador de color); la titulación fue

¹⁶⁵ ASSOCIATION FRANÇAISE DE NORMALISATION (AFNOR). Qualité des sols – Détermination du carbone organique par oxydation sulfochromique. Norme NF X 31-109, 1993. p. 7.

* Para la preparación de la glucosa, 2.5g de C₆H₁₂O₆ fueron diluidos en 100mL de agua destilada.

** Para la preparación del bicromato, 8g de bicromato de potasio fueron diluidos en 100mL de agua destilada.

realizada con una solución de sal de Mohr a 0.2N¹⁶⁸ (se presenta un cambio en la coloración del café oscuro a verde). El volumen equivalente X, en mL, fue registrado.

Por otro lado, 5mL de bicromato de potasio y 7.5mL de ácido sulfúrico fueron titulados con la sal de Mohr, pero sin suelo; el volumen equivalente Y, en mL, también fue registrado.

Para el cálculo del porcentaje de carbono contenido en el suelo, se utilizó la siguiente formula:

$$\% C = \frac{(Y - X) * 0,615 * 100 * a}{m_p * a'}$$

Donde,

| | |
|----------------|---|
| X | Volumen equivalente de Sal de Mohr para la titulación de la muestra |
| Y | Volumen equivalente de Sal de Mohr para la titulación del Blanco |
| m _p | Masa de suelo utilizada para la prueba, en mg |
| a | Volumen total del licor una vez diluido (100ml) |
| a' | Volumen de la alícuota utilizada para la titulación (10ml) |

- Determinación del carbono orgánico: Pérdida al Fuego. Este método fue tomado de la guía para análisis en pedología; fue aplicada porque “las determinaciones clásicas (métodos Walkley y Black, o método ANNE) [...] proporcionan valores muy bajos”¹⁶⁹.

En primera instancia, un ensayo de efervescencia fue llevado a cabo para conocer la presencia de carbonatos de calcio (CaCO₃) o de magnesio (Mg) en el suelo; a pequeñas muestras de suelo Standard y de la mina se les agregó ácido clorhídrico (HCl). El carbonato de calcio (CaCO₃) hace reacción con el ácido clorhídrico en

***Para la preparación de la sal de Mohr, 78.4g de sal pura fueron mezclados con 500mL de agua destilada (calentada hasta ebullición y enfriada al aire) que contenía 20mL de ácido sulfúrico concentrado; la solución fue completada a 1L y conservada en un frasco color ambar.

¹⁶⁹ Baize, Op. cit., p. 257

frío, mientras que la dolomía (un carbonato doble de calcio y magnesio $(\text{CaMg})(\text{CO}_3)_2$) hace efervescencia en calor¹⁷⁰.

Las muestras fueron entonces preparadas para la experiencia de la pérdida al fuego; 1g de suelo Standard y 1g de suelo de mina (fracción < 2mm), ambos en triplicado, fueron puestos en pequeños crisoles correctamente identificados ($F_{1, 2}$ et $S_{1, 2}$ et S_3).

Nota: Debido a la reacción del suelo Standard con el ácido clorhídrico (antes de ser calentadas a 105°C), a estas muestras de suelo les fueron adicionadas 5mL de HCl 4M (mas 1mL de verificación) para hacer reaccionar la totalidad de los carbonatos; luego, las muestras fueron llevadas a 60°C para evaporar el líquido.

Las muestras fueron calentadas a 105°C (en el horno MEMMERT Modell 800) para eliminar la humedad residual presente en el suelo. Después de su enfriamiento en el desecador de vidrio, sus pesos fueron medidos y la masa de suelo contenida en los crisoles fue determinada (m_0 en g).

Luego, las muestras fueron calcinadas a 900°C por un periodo de 12 horas, utilizando un horno NABERTHERM (fotografía 6); después de su enfriamiento en el desecador, sus masas fueron calculadas (m_1 en g).

Fotografía 6. Calcinación de las muestras (horno NABERTHERM)



¹⁷⁰ PLAIS J.M. Une mine de documents sur la glaiezière de Limay - Dosage des minéraux carbonatés [En línea]. France: Académie de Versailles, Banque de données, octobre de 1997. [consultado 20 de Septiembre de 2006]. Disponible en Internet : http://www.acversailles.fr/pedagogi/svt/docpeda/banques/Limay/docs/ana_chim.htm#debut

El carbono orgánico, expresado en porcentaje, se calculó a través de la ecuación:

$$PAF = \frac{m_0 - m_1}{m_0} * 100$$

Donde,

m_0 Masa de suelo, en gramos, secado a 105°C
 m_1 Masa de suelo, en gramos, después de calcinación a 900°C

▪ Análisis granulométrico por sedimentación del suelo de la mina Carreau Wendel. Tres muestras de suelo de mina de la fracción < 2mm ($F_{1, 2 \text{ y } 3}$) y una muestra de suelo Standard (S) fueron preparadas para determinar la proporción y tamaño de las partículas que constituyen dichos suelos; para este análisis fue empleada la norma francesa X 31-107 de Julio de 1982¹⁷¹.

Para la preparación de las muestras, 20g de suelo fueron puestos en un beaker de 600mL y 100mL de peróxido de hidrógeno al 1% (agua oxigenada, H_2O_2) fueron agregados; se observó una efervescencia. Este procedimiento permite destruir la materia orgánica presente en el suelo.

Al final de la efervescencia, la temperatura de las muestras fue elevada hasta 70°C; nuevamente se observó una efervescencia. Después, agua oxigenada al 30% fue adicionada hasta que la efervescencia desapareció. Finalmente, las muestras fueron puestas a ebullición para destruir el H_2O_2 y reducir el volumen de líquido presente en cada una.

En seguida, las muestras fueron puestas en frascos de agitación (propriadamente identificados) de 500mL; se agregó agua destilada (hasta obtener un volumen de 300mL) con 10mL de hexametáfosfato de sodio a 150g/L (dispersante) y 5mL de solución de amoniaco a 20%. Los frascos fueron agitados (agitador rotativo Heidolph REAX 20) durante 2 horas.

¹⁷¹ ASSOCIATION FRANÇAISE DE NORMALISATION (AFNOR). Qualité des sols – Analyse granulométrique par sédimentation, méthode de la pipette. Norme X 31-107, 1993. p. 15.

Posteriormente, las muestras fueron tamizadas a 50µm (lavando con agua destilada las partículas retenidas sobre el cernidor hasta que el líquido salga limpio) y puestas en una probeta de 1000mL (probetas de sedimentación); el volumen de éstas fue completado con agua destilada. La parte > 50µm fue recuperada en una capsula utilizando el mínimo de agua destilada posible.

- Separación de la fracción de suelo > 50µm. La parte > 50µm fue secada en el horno a 105°C (horno EMMERT Modell 800) hasta su secado completo, para ser luego tamizada a 200µm. El resultado del tamizado fue recuperado en crisoles, anteriormente pesados e identificados: arenas gruesas (SG: partículas de suelo cuyo diámetro es inferior a 2mm y superior a 0.2mm) y arenas finas (SF: partículas de suelo cuyo diámetro es inferior a 0.2mm y superior a 0.05mm); luego estas fueron pesadas (M en g).

Para el cálculo de las proporciones de ambas fracciones en las muestras, se aplicó la siguiente ecuación:

$$Sx \% = M_{Sx} * \frac{100}{m_p}$$

Donde,

m_p Masa de suelo utilizada para la prueba, en g

- Separación de la fracción de suelo < 50µm. Las probetas de sedimentación fueron homogeneizadas con 4 agitaciones sucesivas y el tiempo t_0 fue registrado; la temperatura registrada fue de 22°C. Las muestras se encuentran listas para la toma de los 25mL con ayuda de la pipeta de Robinson (fotografía 7). La primera toma corresponde a las partículas < 0.05mm de diámetro (arcillas + limo fino + limo grueso), el segundo concierne las partículas < 0.02mm de diámetro (arcillas + limo fino) y la última toma reúne las partículas < 0.002mm de diámetro (arcillas).

Según la tabla “Tiempos de tomas a la pipeta de Robinson en función de la temperatura °C y de una profundidad constante de la pipeta a 20cm”¹⁷² presente

¹⁷² Ibid., p. 15

en la norma, se determinó que los tiempos (en minutos y segundos) de las dos primeras tomas sería: 1'28" y 9'08" respectivamente.

Fotografía 7. Análisis granulométrico por sedimentación



En lo que concierne la tercera toma, se utilizó la tabla “Profundidades de tomas a la pipeta de Robinson, en función de la temperatura en °C y de un tiempo constante”; según esta tabla, a una temperatura de 22°C y pasadas 6 horas desde el comienzo de la experiencia, la profundidad de toma debe ser de 7.9cm.

Después de realizados las tomas, los volúmenes de las suspensiones fue puesto en capsulas, cuyos pesos habían sido previamente determinados sin humedad (m_x en g y propiamente identificados ($F_{1, 2 y 3}$; $S_{1, 2 y 3}$). Luego, las capsulas fueron llevadas al horno, a una temperatura de 105°C (horno MEMMERT Modell 800) hasta su desecamiento completo. Después del enfriamiento, la masa final de suelo fue registrada (m'_x en g); la diferencia de masas ($M_x = m_x - m'_x$) correspondiente a la masa de suelo de las tomas y secada a 105°C.

Para el cálculo de las proporciones de las diferentes fracciones obtenidas a través de las tomas con la pipeta: Limo grueso (LG: partículas de diámetros superiores a 200µm e inferiores o iguales a 50µm), Limo fino (LF: partículas de diámetros superiores a 2µm e inferiores o iguales a 200µm), y arcillas (A: partículas de diámetro inferior o igual a 200µm), se aplicaron las ecuaciones presentadas a continuación:

Limo grueso:

$$LG \% = (M_1 - M_2) * \frac{1000}{25} * \frac{100}{m_p}$$

Limo fino:

$$LF \% = (M_2 - M_3) * \frac{1000}{25} * \frac{100}{m_p}$$

Arcilla:

$$A \% = (M_3 - S) * \frac{1000}{25} * \frac{100}{m_p}$$

Donde,

m_p Masa de suelo utilizada para la prueba, en g
 S Masa del dispersante en 25ml = 0.04 g

Luego de haber reunido los resultados de las fracciones gruesas y de las tomas a la pipeta, un control de la calidad del análisis granulométrico es realizado por medio del método resumen; este se determina según la adición:

$$\Sigma = SG + SF + LG + LF + A + MO$$

$$\text{Con } 95 < \Sigma < 101$$

- Análisis de los elementos trazas metálicos del suelo de la mina Carreau Wendel. El análisis se constituye de dos partes: la extracción de los elementos trazas metálicos del suelo y la determinación de la cantidad de dichos elementos por espectrofotometría atómica.

Se tiene en cuenta que un suelo Standard contaminado WQB-3 fue utilizado para la verificación del éxito de la extracción de los elementos metálicos contenidos en el suelo; las cantidades (mg/kg) de elementos traza presentes en este suelo son los siguientes¹⁷³:

| | | | |
|----------------|-------------|---------------|--------------|
| - Cobalto (Co) | 15.3 ± 1.5 | - Plomo (Pb) | 240.0 ± 63 |
| - Cromo (Cr) | 119 ± 30 | - Níquel (Ni) | 52.0 ± 6.1 |
| - Cobre (Cu) | 81.6 ± 19.9 | - Zinc (Zn) | 1396.0 ± 107 |

- Extracción de los elementos trazas metálicos solubles en agua regia. El método para la extracción de los elementos trazas fue tomado de la norma francesa NF ISO 11466 de junio 1995¹⁷⁴.

Para esta extracción fue utilizado el suelo de mina de la fracción < 200µm y el suelo Standard a 2mm. Dos muestras de cada tipo de suelo fueron preparadas; la masa de suelo utilizada para la prueba fue de 3g aproximadamente.

Cada muestra de suelo fue puesta en un balón de rodaje cónico de 250mL, debidamente identificado ($F_{1 y 2}$; $S_{1 y 2}$; $SP_{1 y 2}^*$), y humectada con 1mL de agua destilada; luego se le agregaron 21mL de ácido clorhídrico ($[HCl] = 12.0\text{mol/L}$) y 7mL de ácido nítrico ($[HNO_3] = 15.8\text{mol/L}$) gota a gota para evitar fuertes reacciones. Se preparó también una muestra blanco (B), la cual contenía únicamente ácido clorhídrico y nítrico.

A la cámara de absorción le fueron agregados 15 mL ($[HNO_3] = 0.5\text{mol/L}$) de ácido nítrico; el sistema compuesto por los balones de rodaje cónico, el refrigerante y la cámara de absorción fue conectado, y luego fue dejado en reposo durante 16 horas a temperatura ambiente, para permitir la oxidación de la materia orgánica.

Posteriormente, la temperatura de las muestras fue elevada y las muestras fueron mantenidas en ebullición por 2 horas; después de su enfriamiento, se traspasó delicadamente el contenido de la cámara de absorción dentro de los balones,

¹⁷³ INSTITUT NATIONAL DE RECHERCHE SUR LES EAUX. Certificate of analysis: WQB-3, a lake Ontario blended sediment for trace elements. Canada: August, 2001. p. 3.

¹⁷⁴ ASSOCIATION FRANÇAISE DE NORMALISATION (AFNOR). Qualité des sols – Extraction des éléments en trace solubles dans l'eau régale. Norme NF ISO 11466, 1995. p. 5.

* Suelo Standard contaminado WQB-3

agregando 10mL de ácido nítrico ($[\text{HNO}_3] = 0.5\text{mol/L}$) por la parte superior del refrigerante a reflujo.

Cada muestra fue recolectada en un frasco de 100mL, propiamente identificados con la misma nomenclatura, filtrando cuidadosamente el contenido de los balones con papel filtro, y completando con agua destilada el volumen restante; las muestras están listas para ser analizadas.

- Determinación de la cantidad de elementos trazas metálicos contenidos en el suelo de la mina Carreau Wendel por espectrofotometría de absorción atómica. Para este análisis fue utilizado el espectrofotómetro SPECTRAA 55 (varian). (Fotografía 8)

Fotografía 8. Espectrofotómetro de absorción atómica SPECTRAA 55



Inicialmente, con ayuda del manual de instrucciones del espectrofotómetro, se determinó la longitud de onda (en nm) de trabajo del aparato, correspondiente al intervalo de lectura que contenía la concentración (en mg/L) estimada en el suelo para los metales a analizar. Para ello, se consideró que la concentración de cada uno de los metales correspondía a los valores límites permisibles según el Arrêt del 8 de enero 1998 del Ministerio de Agricultura de la República Francesa (los valores se presentan en el numeral 6.2.5. Contaminantes), y estimada para 3g de suelo mineralizado; los metales escogidos para estos análisis fueron: Cobalto (Co), Cobre (Cu), Cromo (Cr), Níquel (Ni), Plomo (Pb) y Zinc (Zn).

Ejemplo: concentración supuesta de Cromo (Cr) presente en 100mL de filtrado (muestra). Según la norma, El valor límite del cromo es 150mg por 1kg de suelo; entonces, la cantidad de cromo existente en 3g de suelo (χ en g) sería de:

$$\chi = \frac{3 * 150 * 10^{-3}}{10^3} = 450 * 10^{-6} \text{ g}$$

Ahora bien, la concentración en cromo (γ en mg/L, equivalente a $\mu\text{g/mL}$) es calculada para el filtrado (100mL):

$$\gamma = \frac{450 * 10^{-6} * 10^3}{100 * 10^{-3}} = 4.5 \text{ mg/l}$$

A partir de este resultado y de los intervalos definidos en el manual de instrucciones del aparato, son escogidos los intervalos óptimos de lectura que determinarán finalmente la longitud de onda a ser utilizada para la medición del contenido del metal correspondiente.

En el caso del cromo, según el manual de utilización del espectrofotómetro existen 5 longitudes de onda de trabajo con sus respectivos intervalos de lectura:

| Longitud de onda nm | Intervalo óptimo de trabajo $\mu\text{g/ml}$ |
|------------------------|---|
| 357.9 | 0.06 – 15 |
| 425.4 | 0.4 – 40 |
| 428.9 | 1 – 100 |
| 520.8 | 20 – 2600 |
| 620.4 | 50 – 6000 |

Por lo tanto, en el caso del cromo, el intervalo que incluye una concentración aproximada de 4.5mg/l de cromo es [0.06 - 15]; por tanto, la longitud de onda a

utilizar en el espectrofotómetro para el análisis de este metal en las muestras sería de 357.9 nm.

Después de haber definido los intervalos de lectura y las longitudes de onda correspondientes para la utilización óptima del espectrofotómetro, se prosiguió a preparar las diferentes gamas de calibración para el aparato (las concentraciones de estas soluciones servirán como punto de referencia para determinar la concentración del metal específico dentro de la muestra analizada). Para la preparación de las gamas fueron utilizadas soluciones Standard de cada metal, cuya concentración era de 1000mg/L, las cuales fueron diluidas en una solución de ácido nítrico (HNO₃) a 1M.

Las gamas de calibración preparadas fueron las siguientes:

Cobalto (Co):

Intervalo de lectura: 0.05 mg/L – 15 mg/L

Longitud de onda: 240.7 nm

Gama (en mg/L): 0 1 5 10

Cobre (Cu):

Intervalo de lectura: 0.03 mg/L – 10 mg/L

Longitud de onda: 324.7 nm

Gama (en mg/l): 0 1 5 10

Cromo (Cr):

Intervalo de lectura: 0.06 mg/L – 15 mg/L

Longitud de onda: 357.9 nm

Gama (en mg/L): 0 1 5 10

Níquel (Ni):

Intervalo de lectura: 0.1 mg/L – 20 mg/L

Longitud de onda: 232 nm

Gama (en mg/L): 0 0.1 1 5

Plomo (Pb):

Intervalo de lectura: 0.5 mg/L – 50 mg/L

Longitud de onda: 217 nm

Gama (en mg/L): 0 0.5 5 10

Zinc (Zn):

Intervalo de lectura: 0.01 mg/L – 2 mg/L

Longitud de onda: 213.9 nm

Gama (en mg/L): 0 0.5 1 2

Habiendo preparado las gamas, se procedió a realizar el análisis con el espectrofotómetro de absorción atómica. En primera instancia se debe indicar en el aparato el metal a analizar y la longitud de onda correspondiente; luego se verifica que el tipo de lámpara de cátodo hueco sea el correcto y que esta se encuentre bien alineada con el detector del aparato (cabe mencionar que no todos los metales pueden ser analizados con la misma lámpara y en una misma posición) y posteriormente, con la llama apagada, se posiciona el quemador.

Después, la señal es regulada con la llama utilizando una de las soluciones de la gama de calibración preparada; este ajuste concierne la altura y profundidad del quemador, la inyección de acetileno y la nebulización de la muestra analizada sobre la llama. Finalmente, la gama de calibración es pasada por el aparato para obtener la curva de absorción; el espectrofotómetro está listo para analizar las muestras.

Después de obtener las lecturas de las concentraciones en metal de las muestras analizadas, los valores son convertidos en cantidad contenida en el suelo seco, es decir que se realiza una conversión de las concentraciones en mg/L a mg/kg; para ello se aplica la fórmula siguiente:

$$\text{Contenido de ETM en el suelo} = \frac{([ETM] - [\text{Blanco}]) * 100 * d}{m_p * W_{dm}}$$

Donde,

| | |
|-----------------|--|
| d | Número de diluciones realizadas para el análisis |
| m _p | Masa de suelo utilizada para la prueba, en g |
| W _{dm} | Contenido de materia seca |

- Determinación de la capacidad de intercambio catiónico (CIC) y de los cationes extraíbles del suelo de la mina Carreau Wendel. Para la determinación de la capacidad de intercambio catiónico fue utilizada la norma francesa NF X 31-130 de mayo 1993¹⁷⁶. Aquí fueron tomados dos muestras de suelo proveniente de la mina de la fracción < 2mm (F_{1y2}), dos muestras de suelo Standard (S_{1y2}) y una muestra blanco (B).

En buretas de percolación en vidrio fueron puestos 2.5g de cada tipo de suelo para atravesar aproximadamente 15mm de un material filtrante constituido de fibra de celulosa no contaminante. Enseguida, fueron agregados 30mL de acetato de amonio a 1mol/L* y se dejó percolar durante una 1 hora; esta operación fue repetida nuevamente. Para conocer el fin de la reacción, se le agregó a la bureta alcohol etílico a 95º hasta comprobar la ausencia de reacción al indicador de color de Nessler.

- Determinación de las bases intercambiables en el acetato de amonio percolado. El acetato de amonio utilizado para cada percolación (60mL aproximadamente) fue recuperado en frascos debidamente identificados para el análisis del contenido de cationes de calcio (Ca^{2+}), magnesio (Mg^{2+}), potasio (K^+) y sodio (Na^+) en el espectrofotómetro de absorción atómica SPECTRAA 55 (Varian). Las soluciones utilizadas para la calibración del espectrofotómetro en el análisis fueron: óxido de calcio (CaO), óxido de magnesio (MgO) y óxido de potasio (K_2O).

Las gamas de calibración preparadas fueron las siguientes:

Óxido de calcio (CaO):

Intervalo de lectura: 2 mg/L – 800 mg/L

Longitud de onda: 239.9 nm

Gama (en mg/L): 100 200 300 400

¹⁷⁶ ASSOCIATION FRANÇAISE DE NORMALISATION (AFNOR). Qualité des sols – Détermination de la capacité d'échange cationique (CEC) et des cations extractibles. Norme X 31-130, 1993. p. 14.

* Para la preparación del acetato de amonio, 77.0g de acetato de amonio fueron puestos en un frasco de 1000mL conteniendo 900mL de agua destilada; el pH fue ajustado a 7 con una solución de amoníaco (NH_4OH) a 1mol/L; la solución fue homogeneizada con un agitador magnético.

Óxido de magnesio (MgO):

Intervalo de lectura: 0.15 mg/L – 20 mg/L

Longitud de onda: 202.6 nm

Gama (en mg/L): 5 10 15 20

Óxido de potasio (K₂O):

Trabajo en emisión

Gama (en mg/L): 2.5 5 10 15

Después de obtener la concentración de los tres óxidos para cada una de las muestras, los valores fueron llevados a cantidad de óxido en el suelo, es decir en mg/kg, aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Contenido de óxido en el suelo} = \frac{([\text{óxido}] - [\text{Blanco}]) * 60}{m_p * W_{dm}}$$

Donde,

m_p Masa de suelo utilizada para la muestra, en g
 W_{dm} Contenido de material seco

Por otro lado, se sabe que 1 mol de cada óxido aporta 200 cmoles positivas por litro de solución; por lo tanto, para calcular el número de cmoles+/kg aportados por cada óxido se utiliza la siguiente fórmula:

$$\text{cmoles positivas por kg de suelo} = \frac{\text{Contenido de óxido en el suelo}}{(M_{\text{óxido}} / 200) * 10^3}$$

Donde,

$M_{\text{óxido}}$ Peso molecular del óxido

Finalmente, la suma del número de cmoles positivas por kg de suelo aportadas por cada uno de los óxidos fue calculada (S en cmoles+/kg); este valor será comparado con el resultado obtenido por titulación con nitrógeno amoniacal.

- Determinación de la CIC por titulación con nitrógeno amoniacal. Después de 24 horas de secado del contenido de la bureta de percolación, la muestra de suelo restante y la masa filtrante fueron puestas en un recipiente, limpiándola cuidadosamente con 50mL de cloruro de sodio (NaCl) a 1mol/L. las soluciones fueron entonces agitadas en el agitador rotativo (programado a 40vueltas/min) durante 1 hora; posteriormente, la totalidad de la solución fue filtrada. Con ayuda del Kjeldis de PROLABO (fotografía 5), 40mL del filtrado fueron destilados; 10mL de ácido bórico ($\rho(\text{H}_3\text{BO}_3) = 20\text{g/L}$) fueron agregados dentro de un frasco cónico de 100mL y puestos a la salida del condensador, de manera que el tubo de salida estuviera sumergido en la solución. Luego, 20mL de hidróxido de sodio ($[\text{NaOH}] = 10\text{mol/L}$) fueron inyectados con ayuda de la bomba del aparato; la destilación esta lista para ser iniciada.

Al recuperar 40mL de destilado aproximadamente, y de obtener un cambio en la coloración de la solución del azul oscuro al azul turquesa, se verifica el fin de la destilación con ayuda de la fenolftaleína (indicador de color).

Posteriormente, algunas gotas de indicador de color* son adicionadas al destilado y la solución sometida a titulación con ácido sulfúrico ($[\text{H}_2\text{SO}_4] = 0.025\text{mol/L}$) hasta el cambio a una coloración violeta; el volumen de ácido utilizado es registrado.

La capacidad de intercambio catiónico (en cmol/kg) es calculada a través de la siguiente fórmula:

$$T = \frac{(V_1 - V_0) * 2c * 50 * 100}{v * m_p}$$

Donde,

| | |
|----------------|---|
| T | Capacidad de intercambio catiónico (cmoles ⁺ /kg) |
| V ₁ | Volumen en mL de la solución de ácido sulfúrico utilizado para la muestra |
| V ₀ | Volumen en mL de la solución de ácido sulfúrico utilizado para el blanco |
| c | Concentración en mol/L de la solución de ácido sulfúrico |
| v | Volumen en mL del destilado utilizado para la titulación (40mL) |
| m _p | Masa de suelo utilizada para la muestra, en g |

* Para la preparación del indicador, 0.1g de verde de bromocresol y 0.02g rojo de metilo fueron disueltos en 100mL de etanol.

- Análisis del contenido en HAP presente en el suelo de la mina del Carreau Wendel. Tres muestras de suelo de mina de la fracción < 2mm fueron enviados a un laboratorio externo para la extracción de los HAP. Para conocer el contenido en HAP presente en el suelo se aplicará la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

La HPLC es un método que permite separa los constituyentes de una mezcla por impulsión, utilizando un solvente (es decir en fase móvil), y luego a lo largo de una fase estacionaria (columna), gracias a la afinidad selectiva de los compuestos orgánicos para los dos tipos de fase.

6.2.5 Contaminantes. Para el experimento se utilizaron varios tipos de contaminantes (orgánicos y minerales). Estos fueron introducidos a una cantidad determinada de suelo, en concentraciones específicas teniendo en cuenta el plano experimental que será descrito posteriormente.

- ♦ Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP). Cuatro HAP representativos de la contaminación antrópica fueron utilizados para llevar a cabo los experimentos: Fenantreno, Fluoranteno, Fluoreno y Pireno; estos fueron introducidos en forma disuelta a una fracción de suelo Standard que luego fue combinada al restante de suelo Standard necesario para la puesta en marcha de la experiencia.

Así pues, 12g de cada uno de los HAP fueron diluidos en 100mL de dimetilformamida (solvente) y luego agregados a 1kg de suelo Standard. Con ayuda de una mezcladora (hormigonera), dicho kilogramo fue mezclado a los 29kg restantes de suelo Standard con el fin de obtener una concentración final de 200mg/kg de cada uno de los HAP.

- ♦ Elementos trazas metálicos (ETM). Para los suelos contaminados por metales, se utilizó el Cobre (Cu), Cromo (Cr), Níquel (Ni), Plomo (Pb) et Zinc (Zn). Estos fueron introducidos en forma de sales, secas o hidratadas, diluidas en agua destilada.

Para cada una de las modalidades del experimento que contuviera metales, el volumen (L) o masa (g) agregado al volumen de suelo fue:

Cobre (Cu): 2.01L de cloruro cúprico dihidratado ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

Cromo (Cr): 2.16g de trióxido de cromo (CrO_3)

Níquel (Ni): 1.52L de cloruro de níquel hexahidrato ($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)

Plomo (Pb): 1.59L de acetato de plomo dihidratado ($\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

Zinc (Zn): 4.84g de cloruro de zinc (ZnCl_2)

Las concentraciones introducidas corresponden a $\frac{1}{4}$ de los valores límites permisibles según el Arrêt del 8 de enero 1998 del Ministerio de Agricultura de la República Francesa; dichos valores se presentan a continuación (tabla 9):

Tabla 9. Valores límites permisibles de metal en el suelo de uso agrícola para la aplicación de lodos industriales

| ETM | Cd | Co | Cr | Cu | Hg | Ni | Pb | Zn |
|----------------------|----|----|-----|-----|----|----|-----|-----|
| Valor límite (mg/kg) | 2 | 3* | 150 | 100 | 1 | 50 | 100 | 300 |

Adaptado por el autor:

Fuente : INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE (INRA). Prescriptions techniques applicables aux épandages de boues sur les sols agricoles. Arrêté du 8 janvier 1998.

* Senil d'anomalie de Godin, 1983. ENTREVISTA con Dominique Morlot, Jefe del Departamento Genio en Biología I.U.T. de Thionville/Yutz. Yutz, 19 de Septiembre de 2006.

Para la preparación de los suelos, 2kg de suelo Standard fueron contaminados con la totalidad de las cantidades de metal descritas anteriormente, y puestos en reposo por una noche. Luego, dicha cantidad de suelo fue mezclada con el restante de suelo Standard necesario para la puesta en marcha del experimento (aproximadamente 56kg de suelo Standard).

Nota: En el caso de los suelos contaminados por HAP y ETM los suelos preparados para cada uno fueron mezclados y homogeneizados.

6.2.6 Diseño experimental. Dos estudios experimentales fueron elaborados sobre sustratos diferentes: un suelo Standard contaminado artificialmente en laboratorio y el suelo proveniente de la mina Carreau wendel (cuyas características se encuentran parcialmente definidas). Para ello, diferentes muestras (testigo y ensayo) de cada suelo fueron preparadas.

♦ Experimento sobre suelo Standard. El plano experimental (Tabla 10) elaborado sobre suelo Standard estéril (tamizado a 2mm) permitió manipular las cinco variables utilizadas en los experimentos, es decir que se las pudo mezclar para poner en evidencia la acción de la biodegradación de *Miscanthus x giganteus* con o sin una asociación de bacterias o *Mycobacterium spn11* únicamente, frente a suelos contaminados con hidrocarburos aromáticos policíclicos y/o elementos en traza metálicos.

Cada tipo de muestra fue identificada con una nomenclatura específica de acuerdo a su composición, la cual estaba constituía de una serie de 5 números, cada uno correspondiente a la existencia de la variable (representado por un “1”) o su ausencia: “0”; el orden e identificación de las variables fue el siguiente: *Miscanthus x giganteus* (MxG), hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), elementos trazas metálicos (ETM), *Mycobacterium spn 11* (Bct) y asociación de 6 colonias diferentes de bacterias (Cost).

Es de mencionar que 6 repeticiones fueron elaboradas para cada modalidad con el objetivo de realizar un mejor análisis estadístico o anticipando a los posibles errores o fracasos.

Tabla 10. Plano experimental sobre SUELO STANDARD (verano 2006)

| MxG | HAP | ETM | Bct | Cost | Nombre | Descripción | # |
|-----|-----|-----|-----|------|---------------------------|--|---|
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | Testigo 0 | Comportamiento del suelo solo | 6 |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | Testigo Cost | Comportamiento del suelo en presencia de la asociación de bacterias | 6 |
| 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | Testigo Bct | Comportamiento del suelo en presencia de <i>Mycobacterium spn 11</i> | 6 |
| 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | Testigo ETM | Comportamiento de ETM solos | 6 |
| 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | Testigo ETM et Cost | Comportamiento de ETM en presencia de la asociación de bacterias | 6 |
| 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | Testigo ETM et Bct | Comportamiento de ETM en presencia de <i>Mycobacterium spn 11</i> | 6 |
| 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | Testigo HAP | Comportamiento de HAP solos | 6 |
| 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | Testigo HAP et Cost | Comportamiento de HAP en presencia de la asociación de bacterias | 6 |
| 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | Testigo HAP et Bct | Comportamiento de HAP en presencia de <i>Mycobacterium spn 11</i> | 6 |
| 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | Testigo ETM et HAP | Comportamiento de ETM y de HAP solos | 6 |
| 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | Testigo ETM et HAP + Cost | Comportamiento de ETM y de HAP en presencia de asociación de bacterias | 6 |
| 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | Testigo ETM et HAP + Bct | Comportamiento de ETM y de HAP en presencia de <i>Mycobacterium spn 11</i> | 6 |
| 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | Ensayo 0 | Comportamiento de la planta sola | 6 |
| 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | Ensayo Cost | Comportamiento de la planta en presencia de la asociación de bacterias | 6 |
| 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | Ensayo Bct | Comportamiento de la planta en presencia de <i>Mycobacterium spn 11</i> | 6 |
| 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | Ensayo ETM | Comportamiento de la planta en presencia de ETM solos | 6 |
| 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | Ensayo ETM et Cost | Comportamiento de la planta en presencia de ETM y la asociación de bacterias | 6 |
| 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | Ensayo ETM et Bct | Comportamiento de la planta en presencia de ETM y de <i>Mycobacterium spn 11</i> | 6 |
| 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | Ensayo HAP | Comportamiento de la planta en presencia de HAP solos | 6 |
| 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | Ensayo HAP et Cost | Comportamiento de la planta en presencia de HAP y de la asociación de bacterias | 6 |
| 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | Ensayo HAP et Bct | Comportamiento de la planta en presencia de HAP y de <i>Mycobacterium spn 11</i> | 6 |
| 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | Ensayo ETM et HAP | Comportamiento de la planta en presencia de ETM y de HAP solos | 6 |
| 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | Ensayo ETM et HAP + Cost | Comportamiento de la planta en presencia de ETM, de HAP y de la asociación de bacterias | 6 |
| 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | Ensayo ETM et HAP + Bct | Comportamiento de la planta en presencia de ETM, de HAP y de <i>Mycobacterium spn 11</i> | 6 |

| <u>Convenciones</u> | <u>Legenda</u> |
|---------------------|---|
| 0 Ausencia | MxG <i>Miscanthus x giganteus</i> |
| 1 Presencia | HAP Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos |
| | ETM Elementos trazas metálicos |
| | Bct Bacteria : <i>Mycobacterium spn 11</i> |
| | Cost Asociación de 6 Colonias diferentes de Bacterias |

TOTAL DE MUESTRAS: 24
TOTAL REPETICIONES POR MUESTRA: 6
NUMERO TOTAL DE INDIVIDUOS: 144

Para establecer el experimento se utilizaron recipientes de jardinería de aproximadamente 14cm de diámetro y 11 cm de profundidad. Cada materia se identificó con la nomenclatura; en total 144 recipientes fueron preparados y distribuidos en 4 mesas, cada mesa constituida de 3 columnas (A, B y C) y 12 filas, y organizadas sistemáticamente en grupos de 4 repeticiones diferentes (Tabla 11).

Tabla 11. Distribución del plano experimental - SUELO STANDARD

| Mesa 1 | | | Mesa 2 | | | Mesa 3 | | | Mesa 4 | | | |
|--------|-------|-------|--------|-------|-------|--------|-------|-------|--------|-------|-------|----|
| A | B | C | D | E | F | A | B | C | D | E | F | |
| 00000 | 10000 | 00101 | 10101 | 01010 | 11010 | 00000 | 10000 | 00101 | 10101 | 01010 | 11010 | 1 |
| 00001 | 10001 | 00110 | 10110 | 01100 | 11100 | 00001 | 10001 | 00110 | 10110 | 01100 | 11100 | 2 |
| 00010 | 10010 | 01000 | 11000 | 01101 | 11101 | 00010 | 10010 | 01000 | 11000 | 01101 | 11101 | 3 |
| 00100 | 10100 | 01001 | 11001 | 01110 | 11110 | 00100 | 10100 | 01001 | 11001 | 01110 | 11110 | 4 |
| 00101 | 10101 | 01010 | 11010 | 00000 | 10000 | 00101 | 10101 | 01010 | 11010 | 00000 | 10000 | 5 |
| 00110 | 10110 | 01100 | 11100 | 00001 | 10001 | 00110 | 10110 | 01100 | 11100 | 00001 | 10001 | 6 |
| 01000 | 11000 | 01101 | 11101 | 00010 | 10010 | 01000 | 11000 | 01101 | 11101 | 00010 | 10010 | 7 |
| 01001 | 11001 | 01110 | 11110 | 00100 | 10100 | 01001 | 11001 | 01110 | 11110 | 00100 | 10100 | 8 |
| 01010 | 11010 | 00000 | 10000 | 00101 | 10101 | 01010 | 11010 | 00000 | 10000 | 00101 | 10101 | 9 |
| 01100 | 11100 | 00001 | 10001 | 00110 | 10110 | 01100 | 11100 | 00001 | 10001 | 00110 | 10110 | 10 |
| 01101 | 11101 | 00010 | 10010 | 01000 | 11000 | 01101 | 11101 | 00010 | 10010 | 01000 | 11000 | 11 |
| 01110 | 11110 | 00100 | 10100 | 01001 | 11001 | 01110 | 11110 | 00100 | 10100 | 01001 | 11001 | 12 |

Fila —↑

♦ Experimento sobre el suelo de la mina Carreau Wendel. Un cultivo de *Miscanthus x giganteus* fue elaborado también sobre el suelo proveniente de la mina Carreau Wendel; en este caso, solamente 3 variables intervinieron en el experimento: *Miscanthus x giganteus*, *Mycobacterium spn 11*, y asociación de 6 colonias diferentes de bacterias. Esta permitiría conocer el potencial de crecimiento de la planta y de las bacterias en este tipo de suelo (cuyo contenido en HAP y ETM sería identificado a través de los análisis descritos anteriormente),

así como la capacidad de degradación de los contaminantes en el suelo. En este experimento, el suelo utilizado correspondió a la fracción < 2mm secada al aire.

El plano experimental se presenta en la tabla 12. La nomenclatura para la identificación de las modalidades también estuvo definida en forma de código binario ("1": presencia de la variable y "0": ausencia); pero la serie estaba conformada sólo por 3 números: el primero correspondía a *Miscanthus x giganteus* (MxG), el segundo a *Mycobacterium spn 11* (Bct) y el último a la asociación de 6 colonias diferentes de bacterias (Cost).

Tabla 12. Plano experimental sobre SUELO DE MINA (verano 2006)

| MxG | Bct | Cost | Nombre | Descripción | # |
|------------|------------|-------------|---------------|---|----------|
| 0 | 0 | 0 | Testigo 0 | Caracterización del suelo | 5 |
| 0 | 1 | 0 | Testigo Bct | Evolución del suelo en presencia de <i>Mycobacterium spn 11</i> | 5 |
| 0 | 0 | 1 | Testigo Cost | Evolución del suelo en presencia de asociación de bacterias | 5 |
| 1 | 0 | 0 | Ensayo 0 | Evolución del suelo en presencia de la planta | 5 |
| 1 | 1 | 0 | Ensayo Bct | Evolución del suelo en presencia de la planta y de Bct | 5 |
| 1 | 0 | 1 | Ensayo Cost | Evolución del suelo en presencia de la planta y de Cost | 5 |

| Conventions | Légende |
|--------------------|---|
| 0 Absence | MxG <i>Miscanthus x giganteus</i> |
| 1 Présence | Bct Bactéria : <i>Mycobacterium spn 11</i> |
| | Cost Asociación de 6 Colonias diferentes de Bacterias |

Total de muestras: 6
Total repeticiones por muestra: 5
Número total de individuos: 30

Así pues, 6 muestras serían preparadas, cada una con 5 repeticiones, en recipientes de jardinería de las mismas dimensiones a los del experimento anterior.

El diseño de la disposición fue sistemático como en el experimento sobre suelo Standard, en grupos de 3 repeticiones diferentes (Tabla 13).

Tabla 13. Distribución del plano experimental – SUELO DE MINA

| A | B | C | |
|-----|-----|-----|----|
| 000 | 100 | 000 | 1 |
| 010 | 110 | 010 | 2 |
| 001 | 101 | 001 | 3 |
| 000 | 100 | 000 | 4 |
| 010 | 110 | 010 | 5 |
| 001 | 101 | 001 | 6 |
| 000 | 100 | 100 | 7 |
| 010 | 110 | 110 | 8 |
| 001 | 101 | 101 | 9 |
| 100 | 110 | 101 | 10 |

Fila 

Hay que resaltar que para este experimento se utilizaron las mismas bacterias y asociación de bacterias de la experiencia sobre suelo Standard.

♦ Instalación de los experimentos. El establecimiento de ambos experimentos se realizó siguiendo las mismas actividades preparatorias, además de presentar condiciones experimentales iguales.

Inicialmente, todos los recipientes fueron distribuidos sobre las mesas y marcados siguiendo el orden establecido anteriormente para cada experimento. Cada recipiente fue acondicionado con esferas de arcilla y un platillo pando pequeño para retener el agua de riego y la pérdida de suelo.

Luego, cada recipiente se llenó con 800g de suelo específico según su nomenclatura (Balanza PRECISA XB 220^a de 10mg de precisión) con ayuda de una pala, la cual era limpiada cada vez que había un cambio en el tipo de suelo. En el caso del experimento sobre suelo Standard, las materias que debían contener HAP se prepararon de primeras, luego las que debían contener ETM y por último las que contenían la mezcla de ambos suelos.

Los brotes de *Miscanthus x giganteus* fueron puestos aproximadamente a 7cm de profundidad en el suelo; el orden del cultivo tuvo en cuenta igualmente el contenido del suelo en cada recipiente para evitar posibles contaminaciones.

Después de la siembra de los brotes de *MxG*, los recipientes fueron irrigados con 180mL de agua destilada. El riego se efectuó a nivel de los platos pandos (es decir, por debajo) para evitar la lixiviación de los compuestos existentes o agregados al suelo.

Las bacterias (*Mycobacterium spn 11* o la asociación de 6 colonias diferentes de bacterias respectivamente) fueron agregadas en forma de solución, con la irrigación de las materas (80mL) por la parte superior, 15 días después de la siembra de *MxG*. El equipo de investigación decidió establecer una fecha posterior para la adición de las bacterias con el fin de propiciar el desarrollo de la planta al principio de la experiencia y por tanto el buen establecimiento del cultivo (en caso tal de que las bacterias tengan efectos negativos sobre la planta).

Hay que resaltar que al suelo Standard que no fue contaminado con HAP y/o ETM, le fue agregado las mismas cantidades de solvente y soluciones neutras correspondientes para la preparación de los contaminantes: 100mL de dimetilformamida (HAP) y agua destilada (ETM). En lo que concierne a las muestras que no fueron enriquecidas con material bacteriológico, estas fueron irrigadas con 80mL de agua fisiológica.

Por otro lado, los dos planos experimentales fueron puestos en un inicio a la sombra y en protección de la lluvia, para luego ser trasladados bajo condiciones medioambientales idénticas. Los experimentos tuvieron una duración aproximada de 3 meses (fotografía 9).

Fotografía 9. Instalación de los experimentos



♦ Levantamiento de la información. Para evaluar los experimentos, dos tipos de información fue tomada en cuenta: el seguimiento del desarrollo de *Miscanthus x giganteus* durante todo el periodo de cultivo, y el análisis físico-químico y biológico de las materias preparadas para cada experiencia.

Debido al número de muestras elaboradas para el experimento sobre suelo Standard y la variabilidad de los resultados obtenidos, se decidió reunir dichas muestras en varios grupos para facilitar el análisis.

Se definieron entonces 4 tratamientos diferentes de acuerdo al contenido en contaminantes: *MxG* sin tratamiento, *MxG* con tratamiento HAP, *MxG* con tratamiento HAP-ETM, *MxG* con tratamiento ETM. Cada tratamiento se constituyó de 3 tipos de muestras a las que se les denominó modalidad; a pesar de que cada modalidad presentaba el mismo contenido en contaminante(s), estas se diferenciaban por su composición bacteriológica.

Así pues, los grupos seleccionados fueron los siguientes:

MxG sin tratamiento se constituía de *MxG* sola (10000), *MxG* con *Mycobacterium spn 11* (10010) y *MxG* con asociación de 6 colonias diferentes de bacterias (10001); estas se representaron con tonalidades verdes.

MxG con tratamiento HAP se constituía de *MxG* con HAP (11000), *MxG* con HAP y *Mycobacterium spn 11* (11010) y *MxG* con HAP y asociación de 6 colonias diferentes de bacterias; representadas con tonalidades azules.

MxG con tratamiento HAP-ETM se constituía de *MxG* con HAP y ETM (11100), *MxG* con HAP, ETM y *Mycobacterium spn 11* (11110) y *MxG* con HAP, ETM de 6 colonias diferentes de bacterias (11101); representados con tonalidades moradas.

MxG con tratamiento ETM se constituía de *MxG* con ETM (10100), *MxG* con ETM y *Mycobacterium spn 11* (10110) y *MxG* con ETM de 6 colonias diferentes de bacterias; representados con tonalidades moradas (10101); representadas con las tonalidades rojas.

En el caso del experimento sobre suelo de la mina, como no hubo adición de contaminantes (HAP o ETM), las muestras se dividieron por modalidades según la existencia y el tipo de bacteria introducida.

Así pues, las modalidades escogidas fueron las siguientes: *MxG* sola (100), *MxG* con *Mycobacterium spn 11* (110) y *MxG* con asociación de 6 colonias diferentes de bacterias (101). El tratamiento fue definido como el conjunto de estas tres modalidades.

- Estudio del desarrollo de *Miscanthus x giganteus*. Las observaciones se procuraron realizar 2 días a la semana (a partir de la aparición del primer brote fuera de superficie); luego las observaciones se llevaron a cabo en lo posible sistemáticamente todos los viernes de cada semana hasta el final de los experimentos.

- Tiempo de brotación de *MxG*. Se elaboró una tabla para registrar la brotación (es decir, la aparición de los brotes de la planta en la superficie del suelo); en el caso de los suelos Standard, los datos fueron discriminados por modalidad según el tipo de tratamiento aplicado (es decir, HAP, ETM o HAP-ETM), o por la presencia o no de bacterias para el caso de los suelos de la mina. La tabla presenta el número de individuos de *MxG* que aparecieron para cada día de observación y la cantidad acumulada en el tiempo. Por otro lado, presenta el porcentaje de brotación en el tiempo (en días) con respecto a la totalidad de individuos de cada modalidad y tratamiento.

- Seguimiento de la altura de *MxG* en el tiempo. El tamaño de las plantas fue notado y registrado cada día de observación en tablas donde se discriminaba el tratamiento y modalidad, para luego realizar los gráficos correspondientes a su evolución.

- Análisis físico-químico y biológico de los recipientes al final de los experimentos. Al cabo de 3 meses de la puesta en marcha de los experimentos, se realizaron los análisis físico-químicos del contenido en HAP, ETM y el estado final de los potes.

Hay que subrayar que para tener una primera aproximación de los resultados de los experimentos, y evitar posibles confusiones durante las manipulaciones o

contaminaciones de las muestras, las repeticiones fueron reagrupadas por tratamiento y modalidad (fotografía 10). Luego, 4 individuos (como máximo) de cada modalidad fueron escogidas al azar para ser analizadas.

Fotografía 10. Clasificación de las repeticiones de acuerdo a su modalidad

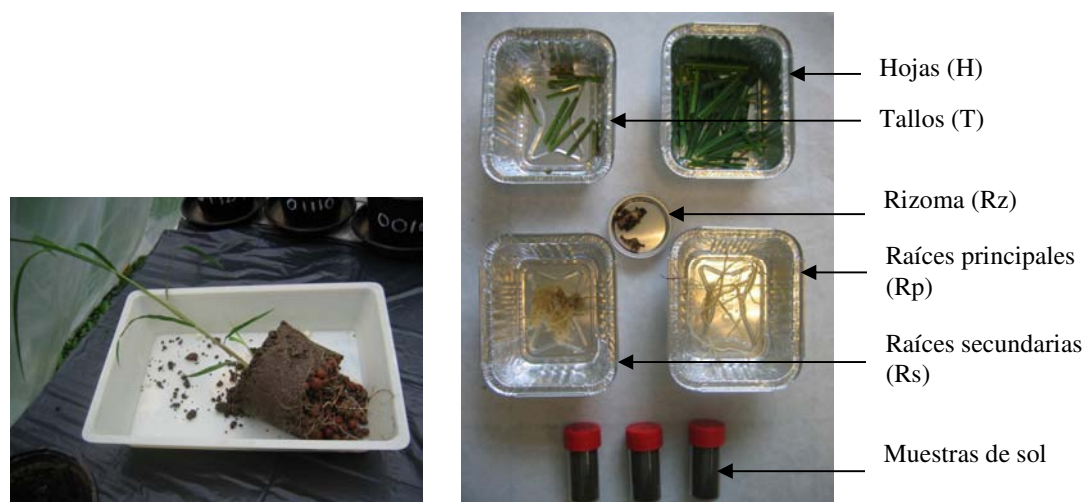


- Análisis biológico de los recipientes: *Miscanthus x giganteus*. Respetando siempre el orden descrito anteriormente, las plantas fueron sacrificadas una por una; el análisis de la planta se realizó en dos etapas: parte aérea y parte subterránea.

En primera instancia, las características de la parte aérea de la planta fueron registradas: altura total, altura del tallo, número y altura de los tallos secundarios; luego la planta fue cortada a ras del suelo. Cada individuo fue puesto en una cubeta de 0.5L pesada (en g) e identificado con el número de la modalidad, repetición y parte de la planta respectivos. Se debe notar que para una de las repeticiones de las modalidades que contenían ETM y el ensayo 0, las hojas y los tallos fueron separados en cubetas diferentes para determinar el posible lugar de acumulación de los metales en la planta. (Fotografía 11)

Después de la extracción de la parte aérea, los recipientes fueron desocupados separando cuidadosamente el suelo de la parte subterránea de la planta. En cubetas previamente identificadas y pesadas (en g), fueron recuperados los rizomas y las raíces de la planta. Se debe notar que para los mismos individuos de las modalidades con ETM y Ensayo 0 seleccionados anteriormente, se separaron las raíces primarias y secundarias con la misma intención para su análisis. (Fotografía 11)

Fotografía 11. Ejemplo de extracción de *Miscanthus x giganteus*



Después de la extracción de la parte aérea, los recipientes fueron desocupados separando cuidadosamente el suelo de la parte subterránea de la planta. En cubetas previamente identificadas y pesadas (en g), fueron recuperados los rizomas y las raíces de la planta. Se debe notar que para los mismos individuos de las modalidades con ETM y Ensayo 0 seleccionados anteriormente, se separaron las raíces primarias y secundarias con la misma intención para su análisis. (Fotografía 11)

Finalmente, la materia fresca (m en g) para cada individuo fue tomada. Luego los individuos fueron secados a 105°C en el horno MEMMERT Modell 800 y posteriormente a su enfriamiento en el desecador, las masas fueron nuevamente tomadas (m' en g). La diferencia entre el peso de la cubeta y m' corresponde a la biomasa de *Miscanthus x Giganteus* (M en g). Aunque el análisis de la biomasa se realiza sólo con la parte aérea de la planta, se decidió realizar igualmente el cálculo para la parte subterránea con el fin de realizar posibles comparaciones en su desarrollo con respecto a los tratamientos aplicados.

Finalmente, las diferentes partes de las plantas serían trituradas para su mineralización y posterior análisis de su contenido en metales pesados en el espectrofotómetro de absorción atómica SPECTRAA 55, siguiendo la metodología descrita anteriormente para el análisis de suelos.

Es necesario mencionar que dos individuos de las modalidades 11110 (comportamiento de *Miscanthus x giganteus* en presencia de HAP, ETM y *Mycobacterium* spn 11) y 10110 (Comportamiento de *Miscanthus x giganteus* en presencia de ETM y *Mycobacterium* spn 11) que no fueron seleccionados para el sacrificio, fueron congelados para el análisis de HAP en la parte aérea, raíces primarias y secundarias de la planta.

- Análisis de los suelos contenidos en los recipientes. Los suelos adheridos a las raíces y rizoma de la planta fueron recuperados cuidadosamente. Una parte fue puesta en frascos de aproximadamente 30mL propiamente identificados con la modalidad y repetición correspondientes (3 repeticiones), y luego congelados a -80°C para su preservación; otra parte fue guardada en cubetas de 0.5L y secada al aire. (Fotografía 11)

Un frasco de cada modalidad que contuviera HAP y sus respectivos testigos fueron secados a 25°C; la extracción de los HAP fue elaborada en un laboratorio externo a través de la metodología de extracción automática por solvente bajo presión (ASE). Los resultados serían analizados con ayuda del HPLC.

Un frasco de cada modalidad que contuviera ETM y sus respectivos testigos fueron triturados y tamizados a 200µm, para ser mineralizados y posteriormente seguir la metodología descrita anteriormente para el análisis de suelos con el espectrofotómetro de absorción atómica SPECTRAA 55.

7. RESULTADOS Y ANÁLISIS

7.1 ANÁLISIS DEL SUELO DE LA MINA CARREAU WENDEL

7.1.1 Separación inicial del suelo de la mina Carreau Wendel. Según los análisis realizados, se constata que el suelo de la mina se encuentra constituido principalmente de elementos finos, < 2mm, cuyo porcentaje ponderal fue de 65% (tabla 14).

Tabla 14. Separación inicial del suelo de la mina Carreau Wendel

| Fracción de suelo | Tamaño | Masa (kg) | % |
|-------------------|--------|--------------|------------|
| Gruesa | > 2 mm | 4,42 | 36,35 |
| Fina | < 2 mm | 7,74 | 63,65 |
| Total | | 12,16 | 100 |

Aunque la fracción de suelo > 2mm solo representa el 35% de porcentaje ponderal, es de resaltar que según las observaciones se encuentra constituida de gravas (0.2cm a 2cm), piedras (2cm a 7.5cm) y restos de escoria o desechos de la actividad que se desarrollaba en la zona.

7.1.2 pH del suelo de la Mina Carreau Wendel. Según los resultados obtenidos en los análisis del pH presentados en la tabla 15, los valores obtenidos para el pH-H₂O indican que los terrenos del Carreau Wendel son suelos neutros (pH entre 6.5 y 7.5).

Se constata que los resultados de pH para la suspensión del suelo en cloruro de potasio (pH-KCl) son bien inferiores a los del agua destilada; esto se debe al intercambio de iones K⁺ con los iones H⁺ retenidos por los minerales arcillosos o las moléculas orgánicas contenidas en el suelo.

Tabla 15. pH del suelo de la Mina Carreau Wendel

| Muestra | pH | |
|---------------------|------------------|------|
| | H ₂ O | KCl |
| Promedio | 6.97 | 6.62 |
| Desviación estándar | 0.05 | 0.03 |

El detalle de los resultados obtenidos para los análisis de pH se pueden observar en el Anexo D.

7.1.3 Contenido en agua y materia seca del suelo de la mina Carreau Wendel. Se constata que la cantidad de agua presente en estos suelos varía según la fracción de suelo analizada. (Tabla 16)

Tabla 16. Contenido en agua y materia seca del suelo de la mina Carreau Wendel

| Muestra | W _{dm} (%) | W _{H₂O} (%) |
|------------------------------|------------------------|------------------------------------|
| Promedio Fracción < 2mm | 98,19 | 1,84 |
| Desviación estándar | 0,03 | 0,04 |
| Promedio Fracción < 200µm | 98,36 | 1,67 |
| Desviación estándar | 0,02 | 0,02 |
| Promedio Fracción >2mm | 98,66 | 1,36 |
| Desviación estándar | 0,42 | 0,43 |

En promedio, la fracción de suelo < 2mm contiene 98.22% de materia seca y 1.84% de agua; en cambio, la fracción < 200µm cuentan sólo con 1.67% de agua y la de partículas > 2mm con 1.36%. Las dos últimas fracciones tienen un mayor contenido de material seco en comparación a la primera, siendo estas de 98.35% y 98.66% respectivamente.

Los resultados detallados de este análisis se presentan en el Anexo D.

7.1.4 Contenido de nitrógeno total del suelo de la mina Carreau Wendel. El suelo de la mina Carreau Wendel presenta un contenido en nitrógeno ligeramente inferior al del suelo Standard, siendo de 1.08mg/g y 1.37mg/g respectivamente (tabla 17).

Tabla 17. Contenido de Nitrógeno del suelo de la mina Carreau Wendel

| Muestra | masa de la muestra (g) | W _N (mg/g) |
|---------------------|------------------------|-----------------------|
| Promedio | 0,20 | 1,08 |
| Desviación estándar | 0,00 | 0,04 |
| Suelo Standard | 0,20 | 1,37 |

Las especificaciones proporcionadas por LUFA (Anexo B) no indican el contenido en nitrógeno presente en los suelos Standard; por lo tanto, no se puede afirmar con certeza que el contenido de nitrógeno encontrado en los suelos corresponde al contenido real.

Ahora bien, si tenemos en cuenta la cantidad de nitrógeno recuperada para los testigos (acetanilida con 0.94mg/g y sulfato de amonio 0.73mg/g, presentados en el Anexo D), se podría considerar que hubo una recuperación parcial de dicho elemento puesto que se esperaba obtener 1mg de nitrógeno en cada uno de los casos (es decir que sólo el 97% y 73% del nitrógeno fue recuperado a través de la metodología aplicada).

Si se aplica el rendimiento de la acetanilida (97%) para calcular el valor esperado de nitrógeno presente las muestras de suelo, se obtienen el sistema de ecuaciones siguiente:

$$\left\{ \begin{array}{l} \chi = 97\% \\ \chi + \gamma = 100\% \end{array} \right\} \quad \text{Por tanto,} \quad \gamma = \frac{100 * \chi}{97} - \chi$$

donde,

$$\chi = \frac{W_N}{\gamma}$$

Cantidad de nitrógeno no recuperada a través de la metodología

Así pues, el contenido promedio de nitrógeno esperado en el suelo de la mina Carreau Wendel y suelo Standard es de 1.11mg/g y 1.41mg/g respectivamente.

Es de mencionar además que durante los análisis se presentaron algunas inconsistencias el cambio parcial en la coloración de las muestras de suelo después de su calentamiento en la estufa Prodigest VI como sucedió en el caso de los testigos y la presencia de depósitos sólidos en el fondo de los frascos.

7.1.5 Contenido en materia orgánica del suelo de la mina Carreau Wendel. Según los análisis realizados a través del método ANNE, se constata que el contenido en carbono orgánico del suelo de la mina es de 12.80%; dicho valor aumenta para el método de la Pérdida al Fuego (17.85%). Es de mencionar que estos dos análisis fueron realizados igualmente para el suelo Standard (Método ANNE: 2.21%; Pérdida al Fuego: 19.96), con el fin de comparar los resultados con las especificaciones de dichos suelos (así pues, se podría determinar el éxito o fracaso en la aplicación de los métodos). (Tabla 18)

Tabla 18. Contenido de carbono orgánico del suelo de la mina Carreau Wendel

| Muestra | % Carbono Orgánico | |
|---------------------------|--------------------|------------------|
| | Método ANNE | Pérdida al Fuego |
| Promedio Suelo de la Mina | 12,80 | 17,85 |
| Desviación Estándar | 2.01 | 0,45 |
| Promedio Suelo Standard | 2,21 | 19,96 |
| Desviación Estándar | 0.08 | 0,10 |

Se podría considerar que el aumento en los resultados obtenidos para el análisis de la Pérdida al Fuego se debe a una posible reacción incompleta de los

carbonatos antes de la puesta en marcha de la experiencia en el caso del suelo Standard, o la presencia de los mismos en el suelo de la mina (aunque no se presentó reacción de efervescencia de este suelo en presencia de ácido clorhídrico).

Pese a la diferencia en los resultados se constata que, si comparamos los resultados obtenidos a través del método ANNE para el suelo Standard (2.21%) con las especificaciones proporcionadas por LUFA (Anexo B), el porcentaje de carbono orgánico recuperado en los análisis hace parte del intervalo de tolerancia establecido por los fabricantes (2.19 ± 0.08 %). Esto permite entonces proponer que el suelo de la mina Carreau Wendel contiene aproximadamente 12.80% de carbón orgánico.

Ahora bien, si se aplica el coeficiente multiplicador 1.724 propuesto para calcular el contenido de materia orgánica en el suelo según la Secretaría de Comercio y Fomento Industrial de México¹⁷⁹, Baize¹⁸⁰ y Charry¹⁸¹, se puede suponer que el suelo de la mina Carreau Wendel tiene aproximadamente 22.07% de materia orgánica, mientras que el suelo Standard contiene 3.81%.

Los resultados detallados de los análisis del porcentaje de carbón orgánico realizados a través de las dos metodologías se presentan en el anexo D.

7.1.6 Composición granulométrica del suelo de la mina Carreau Wendel. El análisis granulométrico de la fracción < 2mm del suelo de la mina reveló que éste se constituye aproximadamente de 74.94% de arenas (> 0.05mm), 10.73% de limos (0.05mm – 0.002mm) y 6.88% de arcillas (< 0.002mm). (Tabla 19)

¹⁷⁹ SECRETARIA DE COMERCIO Y FOMENTO INDUSTRIAL DE MÉXICO. Protección al ambiente – Contaminación del suelo – Residuos sólidos municipales – Determinación de Materia orgánica. Norma Mexicana NMX-AA 021 (1985); p. 6.

¹⁸⁰ BAIZE, D. Guide des analyses en pédologie. Edition n°2. Paris : INRA Editions, 2000. p. 257. ISBN 2-7380-0892-5.

¹⁸¹ CHARRY, J. Naturaleza y propiedades físicas de los suelos. Palmira: Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agropecuarias, 1987. p. 332.

Tabla 19. Granulometría general del suelo de la mina Carreau Wendel

| Muestra | S % | L % | A % |
|---------------------------|------------|------------|------------|
| Promedio Suelo de mina | 74,94 | 10,73 | 6,88 |
| Desviación estándar | 1,02 | 1,22 | 1,14 |
| Suelo Standard | 41,05 | 31,18 | 19,50 |

S: Arenas; L: limos; A: arcillas

Ahora bien, en la tabla 20 se presenta una distribución más detallada de la textura de los suelos; es de notar que los resultados generados para el suelo Standard permiten determinar la precisión de los valores obtenidos.

Tabla 20. Granulometría detallada del suelo de la mina Carreau Wendel

| Muestra | SG % | SF % | LG % | LF % | A % |
|---------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|
| Promedio Suelo de mina | 63,07 | 11,52 | 3,13 | 7,60 | 6,88 |
| Desviación estándar | 1,86 | 2,35 | 0,78 | 0,44 | 1,14 |
| Sol Standard | 8,61 | 32,02 | 12,62 | 18,56 | 19,50 |

SG: arenas gruesas; SF: arenas finas; LG: limos gruesos; LF : limos finos ; A : arcillas

De acuerdo al diagrama de texturas del Service de la Carte des Sols de l'Aisne (propuesto por Jamagne pero modificado desde entonces)¹⁸² se constata que el suelo de la mina Carreau Wendel puede ser clasificado como un suelo de textura aparentemente arenosa.

En cuanto a los resultados obtenidos para el suelo Standard notamos que la distribución USDA propuesta en sus especificaciones de fabricación es muy próxima a la encontrada en las pruebas realizadas. Es de mencionar que en el caso de las arcillas, el porcentaje obtenido (19.5%) se encuentra dentro del

¹⁸² BAIZE, Op. cit., p. 257.

intervalo propuesto por LUFA (Anexo B): 18.0 ± 1.5 ; sin embargo en el caso de las arenas y los limos, los resultados se encuentran aproximadamente 2% por debajo de las especificaciones: 41.05 % en el caso de las arenas (intervalo: 46.5 ± 3.3) y 31.18 % en el caso de los limos (intervalo: 35.5 ± 2.2).

Lo anterior da cierta credibilidad en los resultados encontrados para las pruebas de laboratorio. Las tablas detalladas correspondientes al análisis granulométrico del suelo de la mina Carreau Wendel se presenta en el anexo D.

7.1.7 Elementos trazas metálicos contenidos en el suelo de la mina Carreau Wendel. Los contenidos en elementos trazas presentes en los suelos de la mina Carreau Wendel se observan en la tabla 21; el elemento que presenta aparentemente el mayor contenido es el plomo (96.35mg/kg) seguido del níquel (52.66mg/kg) y el cobre (47.75mg/kg).

Tabla 21. Contenido en elementos trazas metálicos del suelo de la mina Carreau Wendel

| Muestra | Cobalto (Co) mg/kg | Cromo (Cr) mg/kg | Cobre (Cu) mg/kg | Níquel (Ni) mg/kg | Plomo (Pb) mg/kg | Zinc (Zn) mg/kg |
|--|--------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|-----------------------|
| Promedio suelo de mina | 15,07 | 15,58 | 47,75 | 52,66 | 96,35 | 16,08 |
| Desviación estándar | 0,72 | 1,91 | 0,49 | 0,71 | 2,17 | 20,35 |
| Promedio suelo Standard | 5,93 | 15,08 | 12,37 | 23,72 | 42,01 | 9,32 |
| Desviación estándar | 0,24 | 1,20 | 0,24 | 0,01 | 1,42 | 8,38 |
| Promedio suelo Standard Contaminado | 11,64 | 38,62 | 60,54 | 49,24 | 164,26 | 376,08 |
| Desviación estándar | 0,26 | 2,21 | 0,14 | 0,56 | 1,63 | 5,40 |
| Especificaciones | 15,3±1,5 | 119±30 | 81,6±19,9 | 52,0±6,1 | 240±63 | 1396±107 |

Sin embargo, al observar los resultados obtenidos para el suelo Standard Contaminado, notamos que el rendimiento de la metodología no fue satisfactorio; las cantidades de metal recuperado con respecto a las introducidas fue drásticamente inferior en el caso del cromo y el zinc, o sólo se aproximaban a los

límites inferiores de los intervalos de tolerancia propuestos (cobalto, cobre y plomo). Es de resaltar que el níquel fue el único caso que presentó un valor aceptable.

Al calcular el rendimiento para cada uno de los casos (es decir, $r \% = \chi * 100 / \gamma$ donde: r corresponde al rendimiento, χ al contenido de metal encontrado a través de la metodología aplicada e γ la media de la especificación del suelo Standard Contaminado), se obtienen los siguientes valores: 76.08% en cobalto, 32.45% en cromo, 74,19% en cobre, 68.44 % en plomo y 26.94% en zinc.

Para calcular entonces el contenido aproximado de cada elemento traza presente en el suelo, teniendo en cuenta los rendimientos encontrados, se aplica el siguiente sistema de ecuaciones:

$$\left\{ \begin{array}{l} \chi = r \% \\ \chi + \chi' = 100 \% \end{array} \right\} \quad \text{por tanto,} \quad \chi' = \frac{100 * \chi}{r} - \chi$$

donde,

| | |
|---------|--|
| χ | Contenido de metal encontrado (mg/kg) |
| χ' | Cantidad de metal no recuperado a través de la metodología |
| r | rendimiento de la metodología |

Así pues, al calcular el contenido aparente de cada uno de los metales presente en el suelo de la mina Carreau Wendel y compararlo con algunas de los valores mencionados anteriormente en el marco legal de los ETM (tabla 22), se observa que el contenido en plomo, cobre y níquel sobrepasan la mediana en los suelos propuesta por Riffaldi y Levi.

Por otro lado, aunque en todos los casos el contenido no es aparentemente importante según lo propuesto por el Institute of soil science and plant cultivation (ICRLC), se observa que las cantidades de plomo y níquel presentes en el suelo de la mina sobrepasa los límites propuestos por el Arrêté du 8 janvier 1998 para la aplicación de lodos industriales. (Tabla 22)

Tabla 22. Contenido aparente de elementos trazas metálicos en el suelo de la mina Carreau Wendel en relación a algunas normas existentes

| | Cobalto (Co) mg/kg | Cromo (Cr) mg/kg | Cobre (Cu) mg/kg | Níquel (Ni) mg/kg | Plomo (Pb) mg/kg | Zinc (Zn) mg/kg |
|---|-----------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| Contenido aparente en el suelo de la mina | 19.81 | 48.01 | 64.36 | 52.66 | 140.78 | 59.69 |
| INRA (1998) | 3* | 150 | 100 | 50 | 100 | 300 |
| ICRLC (1987) | — | 600 | 130 | 70 | 500 | 300 |
| Mediana en suelos, Riffaldi y Levi (1991) | — | 70 | 30 | 50 | 35 | 90 |

* Senil d'anomalie de Godin, 1983. ENTREVISTA con Dominique Morlot, Jefe del Departamento Genio en Biología I.U.T. de Thionville/Yutz. Yutz, 19 de Septiembre de 2006.

El anexo D presenta información detallada de los resultados obtenidos para el análisis de los elementos trazas metálicos estudiados.

7.1.8 Capacidad de intercambio catiónico del suelo de la mina Carreau Wendel. Los resultados obtenidos para el análisis del acetato de amonio percolado a través del suelo de la mina Carreau Wendel se presentan en la tabla 23. Se observa que la cantidad promedio de cmoles positivas disponibles por kg de suelo de la mina Carreau Wendel (5.98cmoles⁺/kg) es muy inferior a la proporcionada por el suelo Standard (17.02cmoles⁺/kg)

Tabla 23. Análisis del acetato de amonio percolado en el suelo de la mina Carreau Wendel

| Muestra | K₂O (cmoles⁺/kg) | MgO (cmoles⁺/kg) | CaO (cmoles⁺/kg) | S (cmoles⁺/kg) |
|-------------------------|---|--|--|--------------------------------------|
| Promedio suelo de mina | 0,49 | 1,68 | 3,81 | 5,98 |
| Desviación estándar | 0,28 | 0,11 | 0,23 | 0,63 |
| Promedio suelo Standard | 0,70 | 1,44 | 14,88 | 17,02 |
| Desviación estándar | 0,00 | 0,08 | 0,99 | 1,07 |

S: Σ bases intercambiables

Sin embargo, si tenemos en cuenta los resultados obtenidos a través del análisis por titulación con nitrógeno amoniacal (Tabla 24), constatamos que la capacidad de intercambio catiónico promedio del suelo de la mina y el suelo Standard es muy semejante, siendo respectivamente de 10.65cmoles⁺/kg y 12.28cmoles⁺/kg.

Si se tiene en cuenta las especificaciones del suelos Standard, se observa que la capacidad de intercambio catiónico propuesta es de 19meq/100g * por lo tanto, los análisis realizados cuentan con un rendimiento de 64.63%. Así pues, al aplicar el rendimiento se obtiene 16.48cmoles⁺/kg para el suelo de la mina y 19.00cmoles⁺/kg en el caso del suelo Standard.

Tabla 24. Análisis por titulación con nitrógeno amoniacal

| Muestra | CEC (cmoles/kg) |
|----------------------------|----------------------------|
| Promedio suelo de mina | 10,65 |
| Desviación estándar | 1,11 |
| Promedio suelo Standard | 12,28 |
| Desviación estándar | 0,65 |

Ahora bien, al calcular el porcentaje de saturación de bases, con el fin de conocer que tan cerca de la capacidad total de adsorción están los coloides, en relación a las bases (%saturación = Σ bases cambiables / CEC * 100) se obtiene 36.29% de saturación para el suelo de mina y 89.58% de saturación para el suelo Standard.

En el anexo D se pueden observar las tablas detalladas de cada uno de los análisis elaborados para determinar la capacidad de intercambio catiónico del suelo de la mina Carreau Wendel.

* 1 meq/100g es equivalente a 1 cmoles⁺/kg (Baize, 2004)

7.2 RESULTADOS DE LOS EXPERIMENTOS REALIZADOS SOBRE EL SUELO STANDARD

7.2.1 Análisis del desarrollo de *Miscanthus x giganteus*

♦ Tiempo de brotación de *MxG*. En un inicio, un número considerable de brotes de *Miscanthus x giganteus* (*MxG*) no presentaron desarrollo. Así pues, pasados 15 días de haber lanzado el experimento, se decidió hacer una reposición de dichos brotes; estos fueron marcados para realizar su seguimiento. Es de mencionar que 29 brotes fueron remplazados de 72 inicialmente plantados (correspondiente a un 40.28%), de los cuales 12 presentaron un desarrollo pero sólo 6 sobrevivieron hasta el final del experimento.

La aparición de los brotes en la superficie del suelo fue registrada, (Tabla 25). Según los resultados de la tabla, se constata que la reposición de los individuos no fue determinante para el número total de plantas obtenidas al final del experimento, puesto que para el día de la reposición se observa que más del 80% del número final de brotes desarrollados ya se había obtenido para todos los tratamientos.

Es de mencionar que el tratamiento que obtuvo el desarrollo más rápido de los brotes fue el que contenía sólo HAP, con 90% de brotación 15 días después de haber iniciado el experimento, seguido del tratamiento con ETM (88%); en cambio, *MxG* sola o con tratamiento HAP-ETM contaban con un 82%.

Se observa que después de un mes de experimentación, no se presentaron nuevos brotes desarrollados.

Por otro lado, notamos que la única modalidad que presentó un desarrollo del total de brotes de *Miscanthus x giganteus* fue la que contenía elementos traza metálicos acompañados de *Mycobacterium spn 11* (10110). En general, el tratamiento ETM fue el que presentó un mayor número de brotación para todo el experimento, con un 89%.

Tabla 25. Observaciones de la brotación de *Miscanthus x giganteus*

| TIPO DE TRATAMIENTO | | NÚMERO DE BROTES DE <i>MxG</i> QUE APARECIERON EN SUPERFICIE POR DÍA DE OBSERVACIÓN DESPUÉS DE LA PUESTA EN MARCHA DEL EXPERIMENTO | | | | | | | | | | | | Total de brotes | % por modalidad sobre total de brotes plantados | % por tratamiento sobre total de brotes plantados |
|--------------------------------|--|--|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----------------|---|---|
| | | 3 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 13 | 15 | 20 | 22 | 23 | 30 | | | |
| <i>MxG</i> sin tratamiento | 10000 (<i>MxG</i> sola) | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 50 | 17 |
| | 10010 (<i>MxG</i> y Bct) | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 5 | 83 | 28 |
| | 10001 (<i>MxG</i> y Cost) | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 50 | 17 |
| | TOTAL ACUMULADO | 0 | 1 | 3 | 3 | 5 | 6 | 8 | 9 | 9 | 10 | 11 | 11 | 11 | - | 61 |
| | % sobre total de brotes desarrollados | 0 | 9 | 27 | 27 | 45 | 55 | 73 | 82 | 82 | 91 | 100 | 100 | 100 | | |
| <i>MxG</i> tratamiento HAP | 11000 (<i>MxG</i> y HAP) | 2 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 50 | 17 |
| | 11010 (<i>MxG</i> , HAP y Bct) | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 33 | 11 |
| | 11001 (<i>MxG</i> , HAP y Cost) | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 5 | 83 | 28 |
| | TOTAL ACUMULADO | 2 | 3 | 6 | 6 | 7 | 8 | 9 | 9 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | - | 56 |
| | % sobre total de brotes desarrollados | 20 | 30 | 60 | 60 | 70 | 80 | 90 | 90 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | | |
| <i>MxG</i> tratamiento HAP-ETM | 11100 (<i>MxG</i> , HAP y ETM) | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 3 | 50 | 17 |
| | 11110 (<i>MxG</i> , HAP, ETM y Bct) | 0 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 5 | 83 | 28 |
| | 11101 (<i>MxG</i> , HAP, ETM y Cost) | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 50 | 17 |
| | TOTAL ACUMULADO | 0 | 3 | 5 | 5 | 8 | 8 | 8 | 9 | 9 | 11 | 11 | 11 | 11 | - | 61 |
| | % sobre total de brotes desarrollados | 0 | 27 | 45 | 45 | 73 | 73 | 73 | 82 | 82 | 100 | 100 | 100 | 100 | | |
| <i>MxG</i> tratamiento ETM | 10100 (<i>MxG</i> y ETM) | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 5 | 83 | 28 |
| | 10110 (<i>MxG</i> , ETM y Bct) | 0 | 0 | 3 | 0 | 1 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 | 100 | 33 |
| | 10101 (<i>MxG</i> , ETM y Cost) | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 83 | 28 |
| | TOTAL ACUMULADO | 1 | 2 | 6 | 7 | 8 | 9 | 11 | 14 | 15 | 15 | 15 | 16 | 16 | - | 89 |
| | % sobre total de brotes desarrollados | 6 | 13 | 38 | 44 | 50 | 56 | 69 | 88 | 94 | 94 | 94 | 100 | 100 | | |

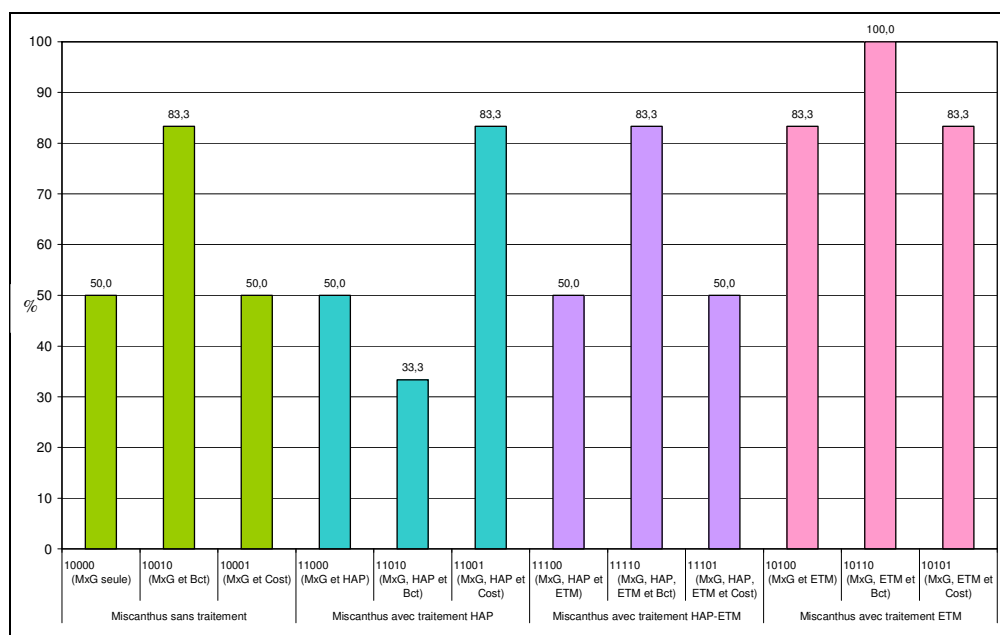
Por su parte, *Miscanthus x giganteus* sin tratamiento y con tratamiento HAP-ETM obtuvieron un 61% de brotación, mientras que *Miscanthus x giganteus* con el tratamiento HAP solamente mostró un 56%.

Si observamos ahora el gráfico del porcentaje de brotación de *Miscanthus x giganteus* en el tiempo por tratamiento (figura 7), se constata que en su mayoría las modalidades que contenía *Mycobacterium spn 11* cuentan con un gran porcentaje de brotación con respecto al número total de brotes sembrados para el experimento. Lo anterior muestra una posible relación positiva entre la bacteria y la planta.

De acuerdo a este mismo gráfico, se podría considerar que los hidrocarburos aromáticos policíclicos pueden afectar posiblemente el desarrollo de los brotes de *Miscanthus x giganteus*. Aunque MxG en compañía de la asociación de 6 colonias diferentes de bacterias presenta una fuerte proporción de brotación (83.3%), en general este fue el tratamiento que presentó el menor promedio ponderado de éxito.

Sin embargo, debido a la existencia de un gran número de fracasos para todo el experimento, es decir la ausencia de brotación con respecto al número total de brotes plantados, no se puede afirmar con certeza la influencia de dichos tratamientos sobre la planta.

Figura 7. Porcentaje de brotación de MxG - Suelo Standard



Hay que tener en cuenta además que, el estado de los brotes al inicio del experimento puede también intervenir en el desarrollo de las plantas; en efecto, no todos los brotes cumplían con el ideal cuando fueron plantados (Ver fotografía 2, numeral 6.2.2). Esta observación no fue registrada o especificada, y por lo tanto no se pueden realizar un análisis comparativo con esta característica.

♦ Evolución de la altura de *MxG* en el tiempo. Durante los 3 meses de experimentaciones, se registró la evolución de la altura de *Miscanthus x giganteus* para cada uno de los individuos, identificando a que tipo de tratamiento y modalidad pertenecían.

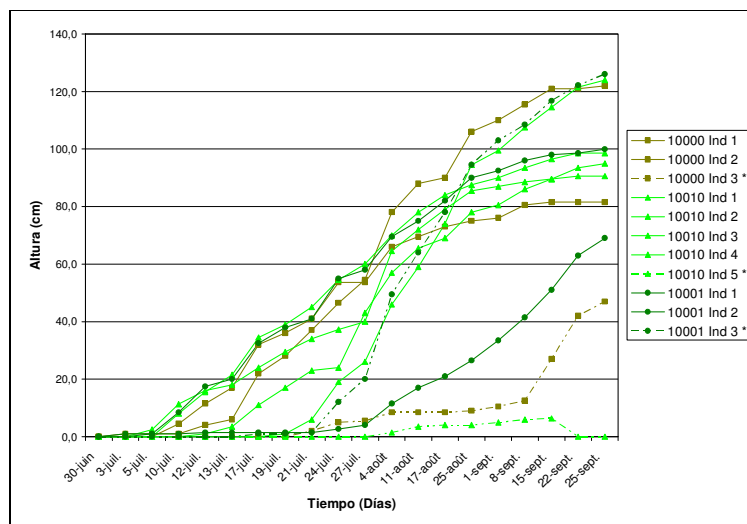
Los valores fueron plasmados en forma de curvas de crecimiento por individuo; debido a la variabilidad que se presentó en los resultados para cada modalidad, estos se agruparon por tratamientos para una mejor visualización e interpretación. Es de mencionar que para cada grafico, las curvas en puntillado fueron utilizadas para representar los individuos cuyos brotes se remplazaron 15 días después de haber iniciado el experimento.

Por otro lado, se elaboraron histogramas donde se compararon los promedios de la altura de la planta al final del experimento, por modalidad para cada tratamiento, además del promedio obtenido en el tratamiento. Es de notar que los histogramas con trama de puntos incluyen los individuos cuyos brotes fueron remplazados 15 días después de iniciado el experimento.

En el caso de *Miscanthus x giganteus* sin tratamiento (figura 8) la mayor altura alcanzada por las plantas fue superior a 120cm para una replica de cada una de las tres modalidades que componen este grupo (lo cual podría considerarse como la altura potencial de la planta). Por otro lado, la menor altura registrada para las repeticiones cuyos brotes no fueron remplazados estuvo alrededor de los 70cm.

Sin importar su modalidad, las repeticiones presentaron en general una tendencia en el crecimiento muy parecida. Esto se resalta para la evolución de la altura de las plantas de *MxG* que se desarrollaron en presencia de *Mycobacterium spn 11*, donde 3 de 5 repeticiones obtuvieron valores muy próximos principalmente al final de las observaciones.

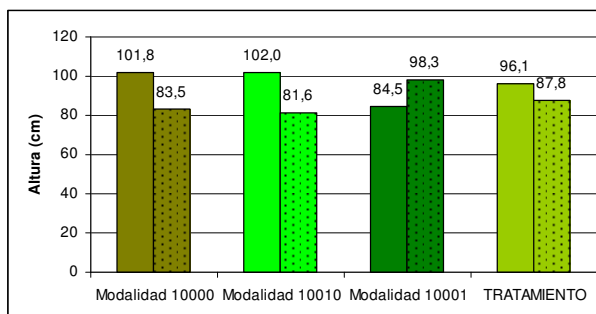
Figura 8. Evolución del crecimiento de *MxG* sin tratamiento



10000: *MxG* sola; 10010: *MxG* y Bct; 10001: *MxG* y Cost
* Individuos Cuyos brotes fueron reemplazados

Ahora bien, si se tienen en cuenta los resultados para el promedio de la altura al final del experimento presentados en la figura 9, notamos que *Miscanthus x giganteus* pudo crecer en promedio 96,1cm aproximadamente. Por otro lado, se podría considerar que la planta puede alcanzar más de 80cm de altura en 3 meses de cultivo.

Figura 9. Altura promedio de *MxG* sin tratamiento

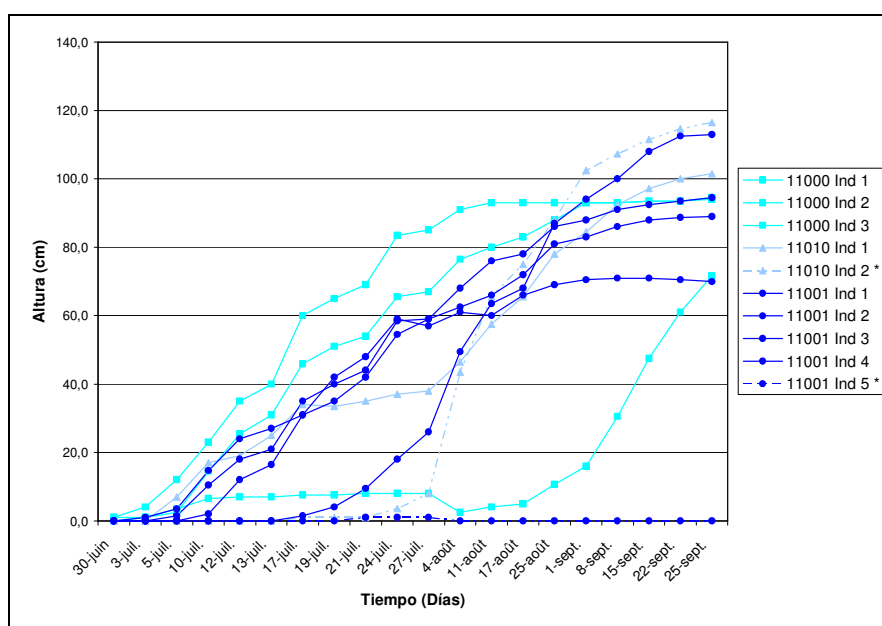


10000: *MxG* sola; 10010: *MxG* y Bct; 10001: *MxG* y Cost

Aunque los promedios fueron muy cercanos, es de mencionar que la mayor altura promedio se presenta para *MxG* en presencia de *Mycobacterium spn 11*.

En lo que concierne a *Miscanthus x giganteus* con tratamiento HAP (figura 10), se presenta una mayor variabilidad en la evolución del crecimiento. Es de resaltar que la altura máxima obtenida por la planta no alcanzó a sobrepasar los 120cm; además, el individuo que más se acercó a los 120cm, corresponde a una repetición realizada de *MxG* en presencia de *Mycobacterium spn 11* para este tratamiento, cuyo brote fue remplazado a los 15 días de iniciado el experimento.

Figura 10. Evolución del crecimiento de *MxG* con tratamiento HAP

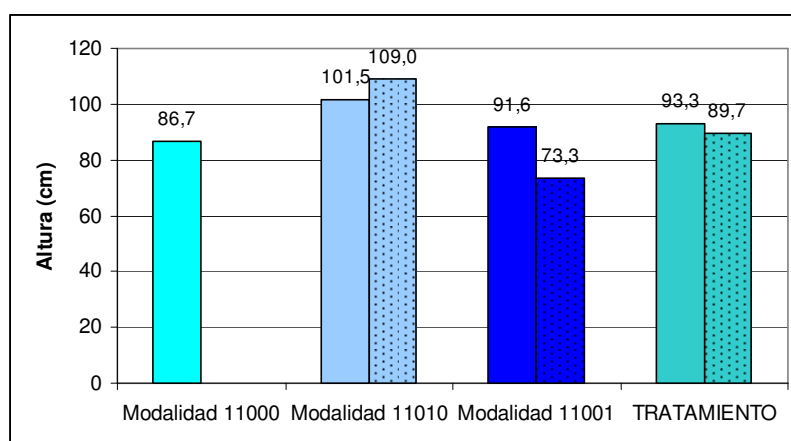


11000: *MxG* y HAP; 11010: *MxG*, HAP y Bct; 11001: *MxG*, HAP y Cost
 * Individuos Cuyos brotes fueron remplazados

En el gráfico también se puede observar que *MxG* en presencia sólo de HAP presenta una estabilización en su crecimiento en el último mes de experimentación, en comparación a las otras modalidades (las cuales contienen material bacteriológico), que sobrepasan la altura de la anterior modalidad casi en 20cm aproximadamente.

Si se observa el gráfico de histogramas (figura 11), notamos que las plantas cultivadas en este tipo de suelos crecieron en promedio 93.3cm.

Figura 11. Altura promedio de *MxG* con tratamiento HAP



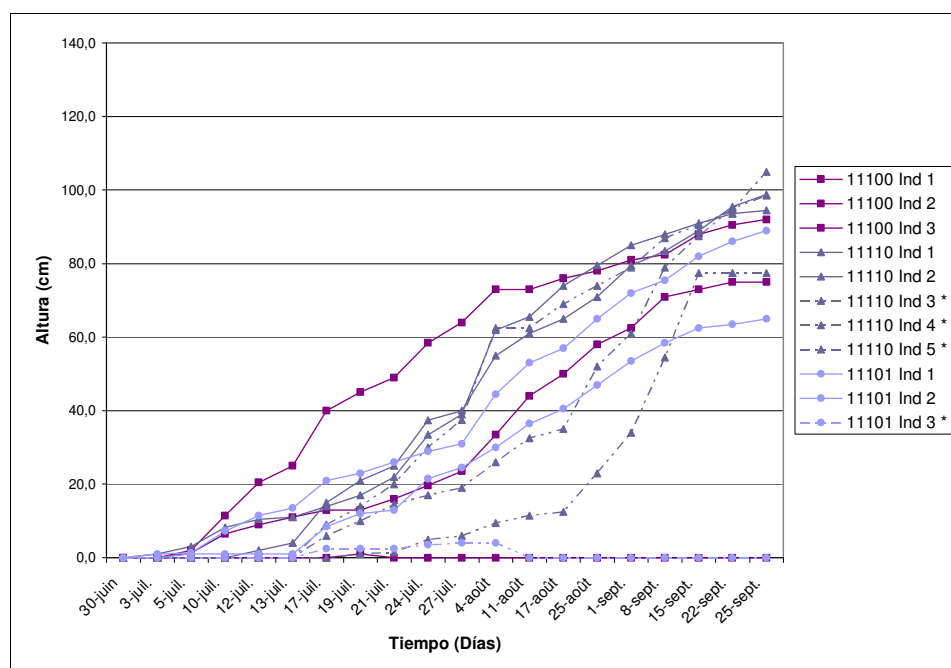
11000: *MxG* y HAP; 11010: *MxG*, HAP y Bct; 11001: *MxG*, HAP y Cost

En esta figura se constata que *Miscanthus x giganteus* en presencia de HAP y *mycobacterium spn 11*, obtuvo el mejor promedio de altura, alcanzando más de 100cm de alto, en comparación con *MxG* con HAP solamente o con HAP y la asociación de bacterias (86.7cm y 91.6cm respectivamente).

Por otro lado, en lo que concierne a *Miscanthus x giganteus* con tratamiento HAP-ETM, notamos que la altura desciende notoriamente en comparación a los tratamientos vistos anteriormente. (Figura 12)

Prácticamente, la mayor altura de las plantas sólo alcanzan los 100cm; es de resaltar que las repeticiones que más se aproximaron a este valor fueron las de la modalidad que contenía *Mycobacterium spn 11*.

Figura 12. Evolución del crecimiento de *MxG* con tratamiento HAP-ETM

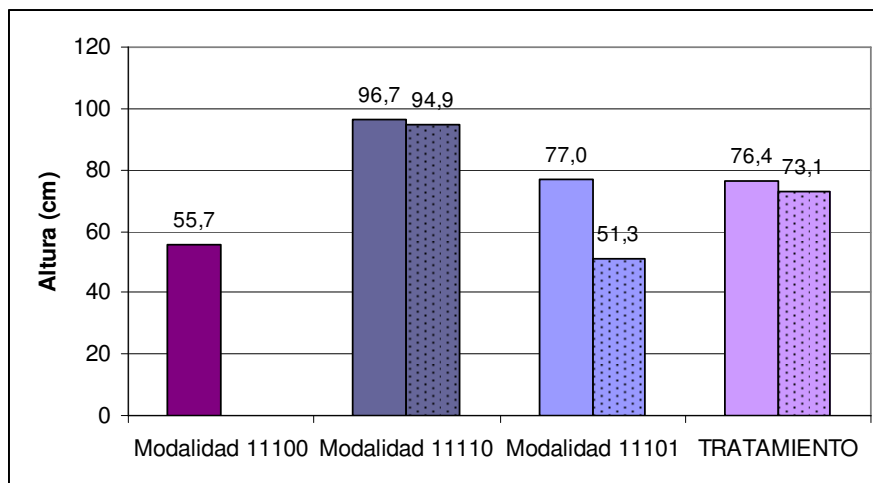


11100: *MxG*, HAP y ETM; 11110: *MxG*, HAP, ETM y Bct; 11101: *MxG*, HAP, ETM y Cost
 * Individuos Cuyos brotes fueron reemplazados

Lo anterior se confirma con el gráfico correspondiente al promedio de la altura para este tratamiento (Figura 13), donde constatamos que al cabo de 3 meses las plantas alcanzaron solamente 76.4cm de altura en promedio para todo el tratamiento.

Se destaca nuevamente la modalidad que contiene *Mycobacterium spn 11* como la que presenta el mejor promedio de crecimiento para *Miscanthus x giganteus* en este tratamiento (96.7cm). Por otro lado, se observa que el desarrollo de la altura de *MxG* en presencia de HAP y ETM parece verse afectado (55cm de alto).

Figura 13. Altura promedio de *MxG* con tratamiento HAP-ETM



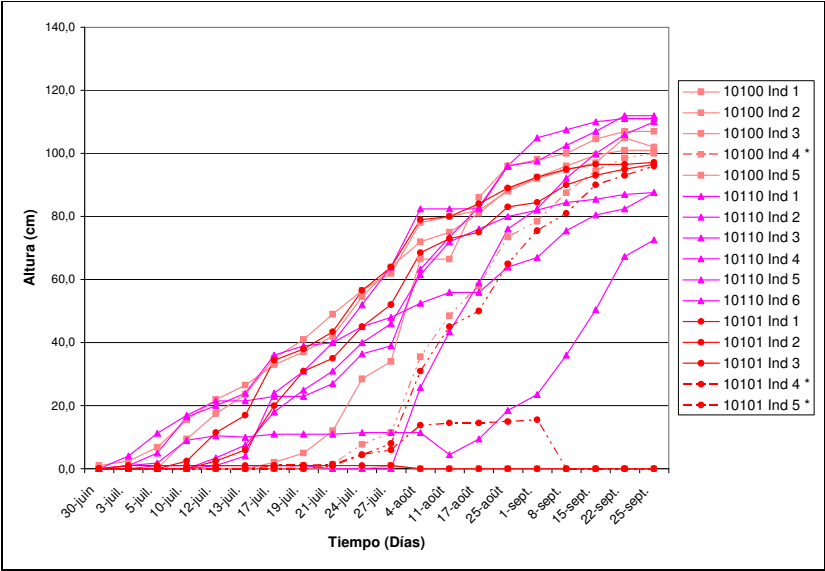
11100: *MxG*, HAP y ETM; 11110: *MxG*, HAP, ETM y Bct; 11101: *MxG*, HAP, ETM y Cost

Finalmente, la mayoría de las plantas de *Miscanthus x giganteus* cultivadas en suelos contaminados sólo con elementos trazas metálicos (figura 14), presentaron una similitud destacable en la evolución de su altura; 10 de 16 plantas tienen tendencia muy parecida en su crecimiento, presentando al final del experimento valores superiores a 90cm de altura aproximadamente.

Se constata nuevamente que las plantas que se encontraban en presencia de *Mycobacterium spn 11* alcanzan los valores más elevados de todo el tratamiento (sobrepasando aparentemente los 110cm de alto), seguidas de *Miscanthus x giganteus* solo con ETM (cuya altura supera los 100cm aproximadamente), y finalmente *MxG* en presencia de la asociación de bacterias (alrededor de los 95cm).

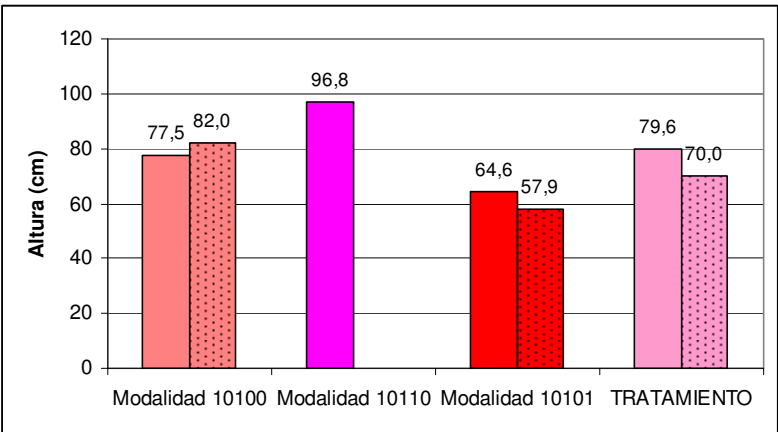
Sin embargo, al observar la figura 15 los promedios de la altura para este tratamiento muestran que *Miscanthus x giganteus* sólo alcanza 79.6cm de altura.

Figura 14. Evolución del crecimiento de *MxG* con tratamiento ETM



10100: *MxG* y ETM; 10110: *MxG*, ETM y Bct; 10101: *MxG*, ETM y Cost
* Individuos Cuyos brotes fueron reemplazados

Figura 15. Altura promedio de *MxG* con tratamiento ETM



10100: *MxG* y ETM; 10110: *MxG*, ETM y Bct; 10101: *MxG*, ETM y Cost

Se resalta nuevamente que *Miscanthus x giganteus* en presencia de *Mycobacterium spn 11* obtuvo el mejor promedio en altura para este tratamiento, con 96.8cm.

Sin embargo, la existencia de individuos cuyos brotes que aún fuera de superficie no presentaron desarrollo en el transcurso de los experimentos, disminuye drásticamente los promedios obtenidos para este tratamiento. Al calcular el promedio de la altura para este tratamiento, sin tener en cuenta dichos brotes, se obtiene una altura promedio de 98.6cm aproximadamente.

Por último, en el anexo E se pueden apreciar los valores de las diferentes alturas registradas a lo largo del experimento.

7.2.2 Análisis físico-químico y biológico de los recipientes. Desafortunadamente, los análisis físico-químicos del experimento no fueron terminados antes de finalizada mi pasantía. Sin embargo, una parte del análisis biológico fue realizada, y se presenta a continuación.

Después del sacrificio de las plantas se llevó a cabo el estudio de la biomasa, el cual fue realizado tanto en la parte aérea como subterránea para todos los individuos. En las tablas a continuación, se presentan los promedios obtenidos para cada modalidad por tipo de tratamiento aplicado; los resultados presentados en **ROJO** en la tabla representan los cálculos elaborados teniendo en cuenta los individuos cuyos brotes fueron remplazados después de haber puesto en marcha el experimento. Es de mencionar que se decidió calcular ambos casos con el fin de comparar la influencia de las plantas que tuvieron 15 días de retraso en su desarrollo, sobre el promedio.

Además, para una mejor observación de los resultados, se elaboraron gráficos de histogramas con el fin de evidenciar la diferencia en la biomasa producida por la parte aérea y subterránea de la planta para cada una de las modalidades que conforman cada tratamiento. En estos gráficos se tuvieron en cuenta igualmente los valores promedio incluyendo los individuos cuyos brotes fueron remplazados (histograma con trama de puntos).

Por otro lado, se calculó el promedio de la relación parte aérea – raíz (PA/R) para cada modalidad y tratamiento, con el fin de conocer al desarrollo aéreo de la planta frente a la producción en materia subterránea. Este se ilustró igualmente en gráficos de histogramas para una mejor interpretación de los resultados; los promedios incluyendo los brotes remplazados 15 después de iniciado el experimento fueron representados en histogramas con trama de puntos.

Notamos que la biomasa producida en promedio por la parte aérea de las plantas para todo el tratamiento fue de aproximadamente 4.08g; las raíces produjeron 2.04g mientras que el rizoma generó 2.59g.

La biomasa producida en el caso de *Miscanthus x giganteus* sin tratamiento se presenta en la Tabla 26.

Tabla 26. Biomasa de *MxG* sin tratamiento

| <i>MxG</i> sin tratamiento | | # de tallos 2 ^{rios} | BIOMASA de <i>MxG</i> (107 °C) | | | |
|----------------------------|------------|----------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|------------------------|
| | | | Parte Aérea (M _{PA} en g) | Parte Subterránea | | TOTAL (PA+R) (g) |
| | | | | Raíces (M _R en g) | Rizoma (M _{RZ} en g) | |
| Modalidad 10000 | Promedio | 2,5 ; 1,7 | 4,42 ; 3,04 | 2,27 ; 1,53 | 3,00 ; 2,17 | 6,69 ; 4,57 |
| | Desviación | 0,7 ; 1,5 | 1,64 ; 2,66 | 0,29 ; 1,29 | 1,50 ; 1,72 | |
| Modalidad 10010 | Promedio | 2,0 | 4,27 | 2,31 | 2,53 | 6,58 |
| | Desviación | 1,4 | 0,49 | 0,30 | 0,52 | |
| Modalidad 10001 | Promedio | 2,5 ; 1,7 | 3,35 ; 3,83 | 1,53 ; 1,71 | 2,24 ; 2,19 | 5,54 ; 4,48 |
| | Desviación | 0,7 ; 1,5 | 2,25 ; 1,80 | 1,51 ; 1,11 | 0,96 ; 0,69 | |
| PROMEDIO TOTAL | | 2,33 ; 1,8 | 4,08 ; 3,71 | 2,04 ; 1,85 | 2,59 ; 2,30 | 6,05 ; 5,56 |
| DESVIACIÓN TOTAL | | 0,29 ; 0,20 | 0,58 ; 0,62 | 0,44 ; 0,41 | 0,44 ; 0,30 | 1,01 ; 1,01 |

PA: Parte aérea; R: Raíces; Rz: Rizoma

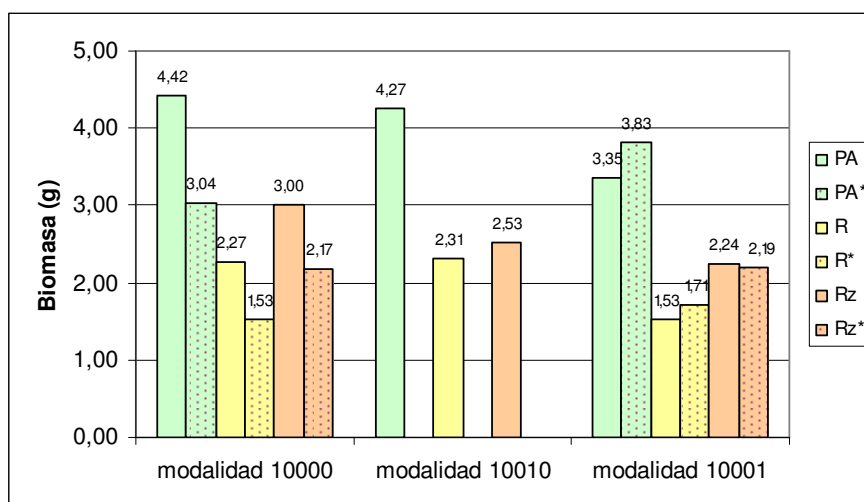
10000: *MxG* sola; 10010: *MxG* y Bct; 10001: *MxG* y Cost

El ROJO representa los cálculos elaborados teniendo en cuenta los individuos cuyos brotes fueron remplazados después de haber puesto en marcha el experimento

Ahora bien, si se observa la figura 16 se constata que *Miscanthus x giganteus* obtiene los mejores resultados en producción de biomasa aérea para la modalidad que no contiene comunidad bacteriana (4.42g).

Sin embargo, los valores obtenidos para *MxG* en presencia de *Mycobacterium spn 11* se aproximan a los anteriores, con 4.27g de biomasa producida; si tenemos en cuenta que esta última modalidad cuenta con un mayor número de repeticiones exitosas (Anexo F), y que los resultados obtenidos para la primera incluyendo los brotes con 15 días de retraso, se podría considerar que las plantas en presencia de *Mycobacterium spn 11*, desarrollaron mayor cantidad de biomasa aérea. Por otro lado, es de mencionar que para medir la biomasa aérea de la planta no fueron separados los brotes secundarios (cuyo número es superior para *MxG* sin presencia de bacterias).

Figura 16. Biomasa por modalidad de *MxG* sin tratamiento



PA: Parte aérea; R: Raíces; Rz: Rizoma
 10000: *MxG* sola; 10010: *MxG* y Bct; 10001: *MxG* y Cost
 * Incluye los resultados de los individuos cuyo brote fue remplazado

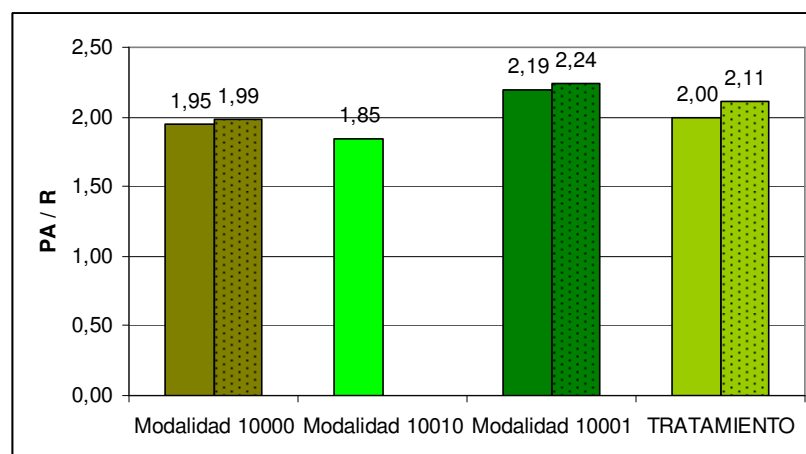
En el caso de la parte subterránea, igualmente se observa que la biomasa producida con por la modalidad *MxG* sola fue de 2.27g producidos en raíces y 3.00g en rizoma, mientras que para la modalidad en presencia de *Mycobacterium*

spn 11 fue de 2.31g y 2.53 respectivamente. Por las mismas razones mencionadas anteriormente (número de éxitos y brotes remplazados), se podría decir que la segunda modalidad desarrolló aparentemente mayor cantidad de biomasa en esta parte de la planta.

Además, al hacer la relación entre la parte aérea y las raíces de las plantas (figura 17), se observa que ésta se encuentra alrededor de 2 en general para todo el tratamiento, lo cual significa que *Miscanthus x giganteus* produce aparentemente el doble de biomasa en su parte aérea con respecto a su raíces.

Sin embargo, aunque los valores encontrados son muy próximos entre si, es de notar que *MxG* en presencia de *Mycobacterium spn 11* aparentemente desarrolló más biomasa de raíces que en las demás modalidades, puesto que la relación PA / R para esta modalidad fue de 1.86 (inferior a 1.95 y 2.19 de *MxG* sola y *MxG* con asociación de bacterias respectivamente).

Figura 17. Relación parte aérea - raíz de *MxG* sin tratamiento



PA: Parte aérea; R: Raíces
10000: *MxG* sola; 10010: *MxG* y Bct; 10001: *MxG* y Cost

Se aprecia también que el menor desarrollo de raíces para las plantas se mostró en presencia de la asociación de 6 colonias diferentes de bacterias, con PA / R igual a 2.19.

En el caso de *Miscanthus x giganteus* con tratamiento HAP notamos que el promedio de biomasa producido por la planta para todo el tratamiento fue de 4.29g en su parte aérea, 2.14g en las raíces y 2.29g en el rizoma. (Tabla 27)

Tabla 27. Biomasa de *MxG* con tratamiento HAP

| <i>MxG</i> con tratamiento HAP | | # de tallos 2 ^{rios} | BIOMASA de <i>MxG</i> (107 °C) | | | |
|--------------------------------|------------|----------------------------------|--|---------------------------------|----------------------------------|------------------------|
| | | | Parte Aérea (M _{PA} en g) | Parte Subterránea | | TOTAL (PA+R) (g) |
| | | | | Raíces (M _R en g) | Rizoma (M _{RZ} en g) | |
| Modalidad 11000 | Promedio | 2,0 | 3,90 | 1,72 | 2,48 | 5,62 |
| | Desviación | 2,0 | 2,89 | 1,47 | 1,50 | |
| Modalidad 11010 | Promedio | 3,0 ; 2,5 | 4,67 ; 4,44 | 2,35 ; 2,07 | 2,04 ; 1,92 | 7,02 ; 6,51 |
| | Desviación | 0,0 ; 0,7 | 0,0 ; 0,33 | 0,0 ; 0,40 | 0,0 ; 0,17 | |
| Modalidad 11001 | Promedio | 2,5 | 4,31 | 2,36 | 2,36 | 6,67 |
| | Desviación | 0,6 | 0,11 | 0,31 | 0,66 | |
| PROMEDIO TOTAL | | 2,5 ; 2,33 | 4,29 ; 4,22 | 2,14 ; 2,05 | 2,29 ; 2,25 | 6,44 ; 6,27 |
| DESVIACIÓN TOTAL | | 0,5 ; 0,25 | 0,39 ; 0,28 | 0,37 ; 0,32 | 0,23 ; 0,29 | 0,73 ; 0,57 |

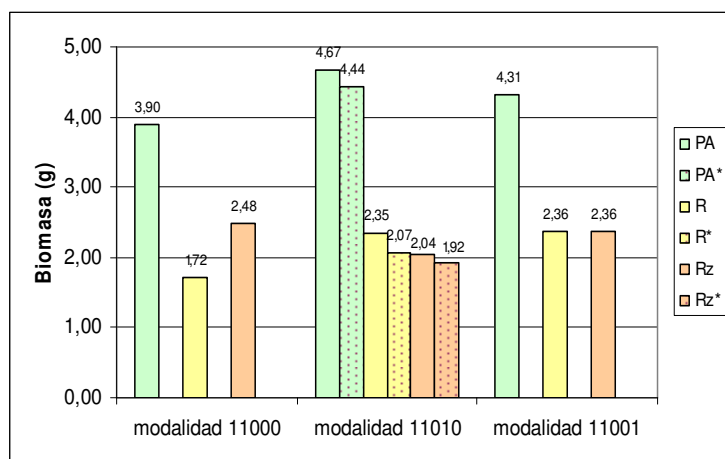
PA: Parte aérea; R: Raíces; Rz: Rizoma
11000: *MxG* y HAP; 11010: *MxG*, HAP y Bct; 11001: *MxG*, HAP y Cost

Al observar la figura 18 se constata que la biomasa aérea producida por *MxG* en presencia de *Mycobacterium spn 11* es superior a las demás modalidades (incluyendo o no los individuos de brotes remplazados).

Es de notar que para este tratamiento, *Miscanthus x giganteus* en presencia de la asociación de 6 colonias de bacterias resistentes y posiblemente capaces de degradar los HAP, presento una biomasa aérea y subterránea (raíces y rizoma) notable, cercana en el caso de la parte aérea a la anterior modalidad y superior para la producida por raíces y rizoma. (4.31g, 2.36g y 2.36g respectivamente).

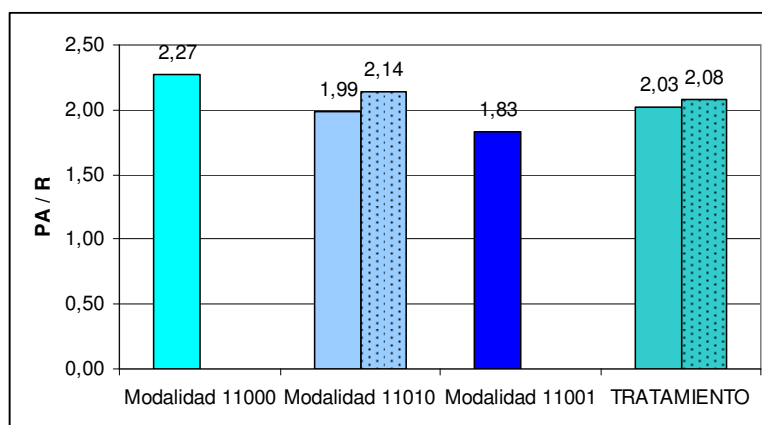
En la figura 19, se constata que al igual que el tratamiento anterior, la producción de biomasa aérea es aproximadamente el doble de la producida por las raíces (PA / R = 2.03).

Figura 18. Biomasa *MxG* con tratamiento HAP



PA: Parte aérea; R: Raíces; Rz: Rizoma
 11000: *MxG* y HAP; 11010: *MxG*, HAP y Bct; 11001: *MxG*, HAP y Cost
 * Incluye los resultados de los individuos cuyo brote fue remplazado

Figura 19. Relación parte aérea - raíz de *MxG* con tratamiento HAP



PA: Parte aérea; R: Raíces
 11000: *MxG* y HAP; 11010: *MxG*, HAP y Bct; 11001: *MxG*, HAP y Cost

Al observar la figura notamos que en ausencia de bacterias, las plantas presentaron una menor producción de biomasa en raíces, puesto que presenta el valor más alto para la relación ($PA / R = 2.27$).

Por su parte, la relación parte aérea – raíces para la modalidad de *MxG* en presencia de la asociación de 6 colonias de bacterias presentó el promedio mas bajo con 1.83; considerándose esta modalidad con mejor desarrollo del sistema de raíces.

El crecimiento de *Miscanthus x giganteus* en presencia de HAP y ETM se presenta en la tabla 28. Aquí notamos una disminución del promedio de la biomasa producida por la planta para la totalidad del tratamiento; la biomasa aérea fue de 3.00g, las raíces produjeron 1.77g y el rizoma 2.09g aproximadamente.

Tabla 28. Biomasa de *MxG* con tratamiento HAP - ETM

| <i>MxG</i> con tratamiento HAP - ETM | | # de tallos 2 ^{rios} | BIOMASA de <i>MxG</i> (107°C) | | | |
|---|------------|----------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|------------------------|
| | | | Parte Aérea (M _{PA} en g) | Parte Subterránea | | TOTAL (PA+R) (g) |
| | | | | Raíces (M _R en g) | Rizoma (M _{RZ} en g) | |
| Modalidad 11100 | Promedio | 2,0 | 3,39 | 2,48 | 2,53 | 5,87 |
| | Desviación | 0,0 | 1,22 | 0,39 | 1,17 | |
| Modalidad 11110 | Promedio | 1,5 ; 2,0 | 2,97 ; 3,18 | 1,60 ; 1,74 | 1,84 ; 1,87 | 4,57 ; 4,92 |
| | Desviación | 0,8 | 0,70 ; 0,46 | 0,39 ; 0,31 | 0,35 | |
| Modalidad 11101 | Promedio | 2,0 | 2,64 | 1,52 | 1,90 | 4,16 |
| | Desviación | 0,0 | 0,81 | 0,22 | 0,43 | |
| PROMEDIO TOTAL | | 1,8 ; 2,0 | 3,00 ; 3,07 | 1,77 ; 1,82 | 2,09 ; 2,10 | 4,87 ; 4,98 |
| DESVIACIÓN TOTAL | | 0,3 ; 0,0 | 0,38 ; 0,79 | 0,37 ; 0,35 | 0,38 ; 0,38 | 0,89 ; 0,86 |

PA: Parte aérea; R: Raíces; Rz: Rizoma

11100: *MxG*, HAP y ETM; 11110: *MxG*, HAP, ETM y Bct; 11101: *MxG*, HAP, ETM y Cost

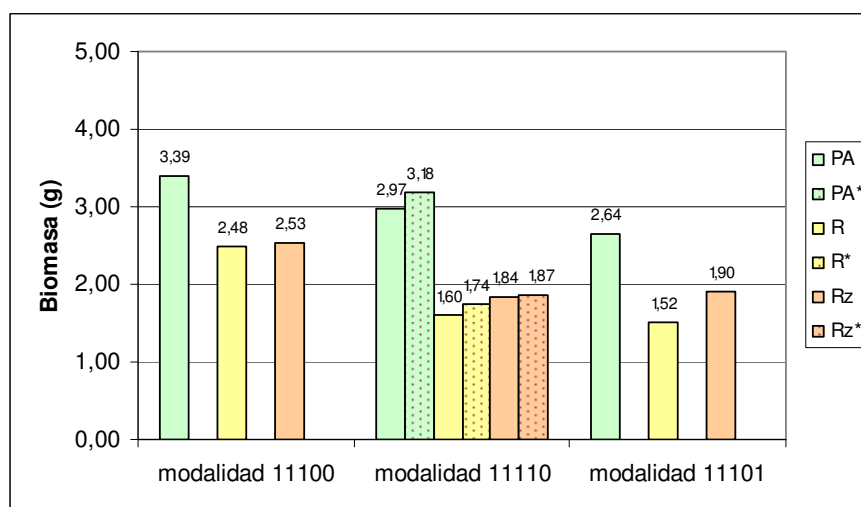
Es de resaltar que en este tratamiento, la inclusión de los valores de biomasa producidos por *MxG* cuyos brotes fueron remplazados 15 días después de iniciado

el experimento, aumenta el promedio general para cada una de las partes de la planta: 3.07g para la parte aérea, 1.82g para las raíces y 2.10 para el rizoma.

La figura 20 muestra que la mayor producción de biomasa aérea corresponde a *Miscanthus x Giganteus* sin presencia bacteriana (3.39g en comparación a 3.18g para *MxG* en presencia de *Mycobacterium spn 11* y 2.64g en presencia de la asociación de las 6 colonias de bacterias).

Se observa también que hubo una buena producción en biomasa de raíces y rizoma para la misma modalidad (2.48 y 2.53 respectivamente), siendo las mas elevadas de todo el tratamiento.

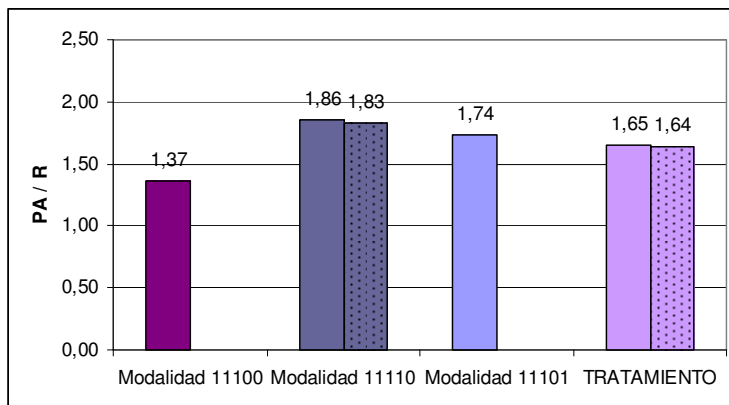
Figura 20. Biomasa *MxG* con tratamiento HAP-ETM



PA: Parte aérea; R: Raíces; Rz: Rizoma
 11100: *MxG*, HAP y ETM; 11110: *MxG*, HAP, ETM y Bct; 11101: *MxG*, HAP, ETM y Cost
 * Incluye los resultados de los individuos cuyo brote fue remplazado

Ahora bien, los resultados de la figura 21 muestran que *Miscanthus x giganteus*, bajo la influencia de HAP y ETM simultáneamente, presenta posiblemente un mayor desarrollo del sistema de raíces.

Figura 21. Relación parte aérea - raíz de *MxG* con tratamiento HAP-ETM



PA: Parte aérea; R: Raíces

11100: *MxG*, HAP y ETM; 11110: *MxG*, HAP, ETM y Bct; 11101: *MxG*, HAP, ETM y Cost

Se observa un descenso en el promedio de la relación parte aérea – raíces, en comparación a los tratamientos presentados anteriormente. La biomasa producida en la parte aérea fue 1.65 veces superior a la producida por las raíces.

En este tratamiento se constata que el mejor desarrollo de las raíces de *MxG* concierne la modalidad *MxG* sin microorganismos (PA / R = 1.37), seguido de *MxG* con asociación de 6 colonias de bacterias (PA / R = 1.74), y finalmente *MxG* con *Mycobacterium spn 11* (PA / R = 1.86).

En lo que concierne el desarrollo de *Miscanthus x giganteus* con tratamiento ETM notamos que en 3 meses de cultivo la planta produjo en promedio 4.14g de biomasa aérea, 2.02g en biomasa de raíz y 2.53g en biomasa de rizoma. (Tabla 29)

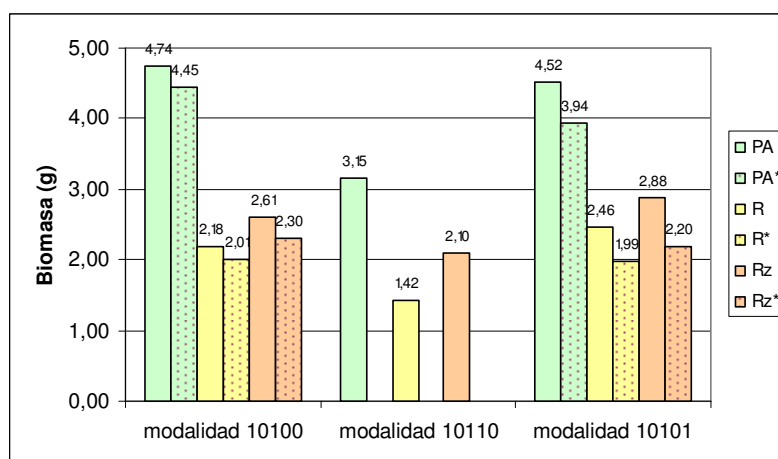
Si se tiene en cuenta las proporciones de biomasa producidas por modalidad presentadas en la figura 22, se observa que las plantas que generaron menor biomasa aérea correspondían a las de la modalidad *MxG* en presencia de *Mycobacterium spn 11* (3.15g aproximadamente).

Tabla 29. Biomasa de *MxG* con tratamiento ETM

| <i>MxG</i> con tratamiento ETM | | # de tallos 2 ^{ños} | BIOMASA de <i>MxG</i> (107°C) | | | |
|--------------------------------|------------|---------------------------------|--|---------------------------------|----------------------------------|------------------------|
| | | | Parte Aérea (M _{PA} en g) | Parte Subterránea | | TOTAL (PA+R) (g) |
| | | | | Raíces (M _R en g) | Rizoma (M _{RZ} en g) | |
| Modalidad 10100 | Promedio | 2,3 ; 2,5 | 4,74 ; 4,45 | 2,18 ; 2,01 | 2,61 ; 2,30 | 6,92 ; 6,42 |
| | Desviación | 0,6 | 0,40 ; 0,70 | 0,26 ; 0,41 | 0,65 ; 0,90 | |
| Modalidad 10110 | Promedio | 1,8 | 3,15 | 1,42 | 2,1 | 4,57 |
| | Desviación | 1,3 | 1,70 | 0,95 | 0,8 | |
| Modalidad 10101 | Promedio | 3,5 ; 3,7 | 4,52 ; 3,94 | 2,46 ; 1,99 | 2,88 ; 2,2 | 6,98 ; 5,93 |
| | Desviación | 0,7 ; 0,6 | 0,1 ; 1,00 | 0,09 ; 0,81 | 0,51 ; 1,2 | |
| PROMEDIO TOTAL | | 2,5 ; 2,67 | 4,14 ; 3,85 | 2,02 ; 1,81 | 2,53 ; 2,2 | 4,63 ; 4,13 |
| DESVIACIÓN TOTAL | | 0,9 ; 0,97 | 0,87 ; 0,66 | 0,54 ; 0,33 | 0,94 ; 0,09 | 1,37 ; 0,97 |

PA: Parte aérea; R: Raíces; Rz: Rizoma
10100: *MxG* y ETM; 10110: *MxG*, ETM y Bct; 10101: *MxG*, ETM y Cost

Figura 22. Biomasa de *MxG* con tratamiento ETM



PA: Parte aérea; R: Raíces; Rz: Rizoma
10100: *MxG* y ETM; 10110: *MxG*, ETM y Bct; 10101: *MxG*, ETM y Cost
* Incluye los resultados de los individuos cuyo brote fue reemplazado

La mayor biomasa aérea fue producida por *MxG* sin microorganismos, con 4.74g de materia seca recuperada al final del experimento. Sin embargo, se constata que *MxG* en presencia de la asociación de 6 colonias de bacterias produjo una cantidad muy similar en biomasa aérea (4.52g).

En cuanto a la producción de biomasa subterránea, *MxG* en presencia de la asociación de bacterias presentó los mejores resultados para las raíces (2.46g) y el rizoma (2.88g), seguido de *MxG* sin presencia de bacterias (2.18g y 2.61g respectivamente).

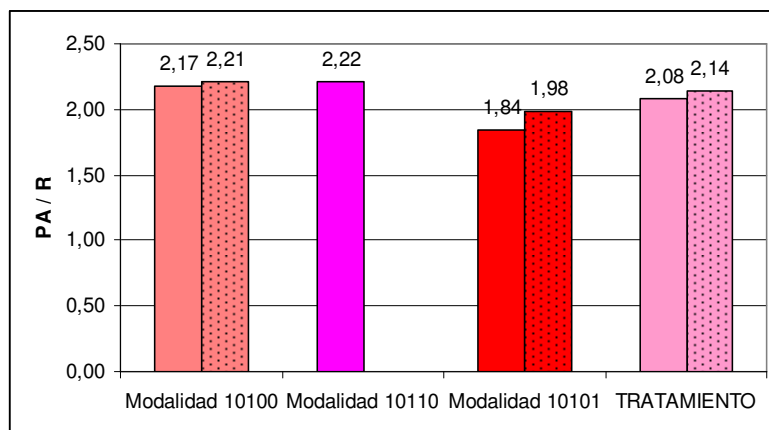
Al observar la figura correspondiente a la relación parte aérea – raíces (Figura 23), notamos que nuevamente la biomasa promedio producida por los tallos y las hojas es el doble que la producida por las raíces ($PA / R = 2.08$); por tanto se podría decir que hay un menor desarrollo de las raíces en comparación al tratamiento anterior (cuya relación fue de $PA / R = 1.65$), pero posiblemente “normal” con respecto a las plantas que se desarrollaron sin presencia de contaminantes ($PA / R = 2.00$).

La biomasa producida por las raíces es menos importante en los casos de *MxG* en presencia de *Mycobacterium spn 11* ($PA / R = 2.22$) o *MxG* sin presencia de bacterias ($PA / R = 2.17$).

Nuevamente, *Miscanthus x giganteus* en compañía de la asociación de 6 colonias diferentes de bacteria cuenta con la relación PA / R más baja, con un valor promedio de 1.84; es decir, que las plantas presentaron un mejor desarrollo de sus raíces.

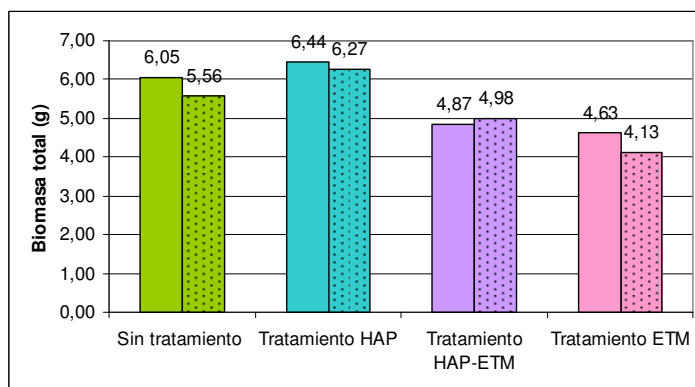
Por otra parte, el gráfico correspondiente al promedio total de biomasa (es decir, la sumatoria de la biomasa aérea y de raíces) producida por *Miscanthus x giganteus* para cada uno de los tratamientos aplicados se presentan en la figura 24; es de mencionar que, debido a la variabilidad en el desarrollo de los rizomas, éste no se tuvo en cuenta para el cálculo de la biomasa total. Los histogramas con trama de puntos representan los valores calculados teniendo en cuenta las repeticiones cuyos brotes fueron remplazados 15 días después de iniciado el experimento.

Figura 23. Relación parte aérea - raíz de *MxG* con tratamiento ETM



PA: Parte aérea; R: Raíces
 10100: *MxG* y ETM; 10110: *MxG*, ETM y Bct; 10101: *MxG*, ETM y Cost

Figura 24. Biomasa total (PA + R) promedio de *MxG* por tratamiento



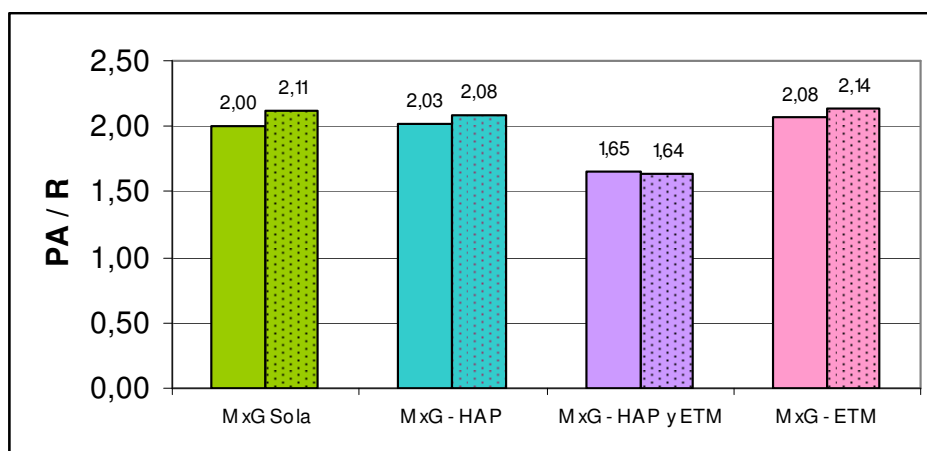
En la figura se puede apreciar que *Miscanthus x giganteus* con tratamiento HAP o sin tratamiento, presentaron los mayores valores de biomasa total promedio, alcanzando aproximadamente los 6.44g y 6.05g respectivamente.

La modalidad con menor biomasa total promedio recuperada al final del experimento fue *MxG* con tratamiento ETM; las plantas alcanzaron solamente 4.63g.

Por otro lado, al observar la figura 25 correspondiente a la relación parte aérea – raíz promedio para todos los tratamientos, notamos que *Miscanthus x giganteus* con tratamiento HAP – ETM presenta un mejor desarrollo des sistema de raíces, con un resultado de 1.65.

En el caso de *MxG* sin tratamiento, *MxG* con tratamiento HAP o *MxG* con tratamiento ETM, constatamos que presentan valores muy parecidos para dicha relación. Es de mencionar que en estos casos, la biomasa producida por la parte aérea de la planta es prácticamente el doble de la desarrollada en sus raíces.

Figura 25. Relación parte aérea - raíz promedio de *MxG* para cada tratamiento



7.3 RESULTADOS DE LOS EXPERIMENTOS REALIZADOS SOBRE EL SUELO DE LA MINA CARREAU WENDEL

7.3.1 Análisis del desarrollo de *Miscanthus x giganteus*. Los resultados obtenidos para el experimento sobre el suelo de la mina no fueron muy satisfactorios. Es de mencionar que en este caso, pese a la ausencia de desarrollo para algunos de los

brotos plantados, estos no fueron remplazados como en el experimento realizado sobre suelo Standard.

♦ Tiempo de brotación de *MxG*. En este experimento se observó que *Miscanthus x giganteus* al ser cultivada sobre el suelo de la mina, aparentemente presenta un mejor desarrollo en compañía de la asociación de 6 colonias diferentes de bacterias, puesto que presentó el mayor número de brotes desarrollados (100% de brotación); las otras dos modalidades solamente presentaron un 40% de brotación (es decir, 2 de 5 repeticiones realizadas). Los resultados se observan en la tabla 30.

Tabla 30. Observaciones de la brotación de *Miscanthus x giganteus*

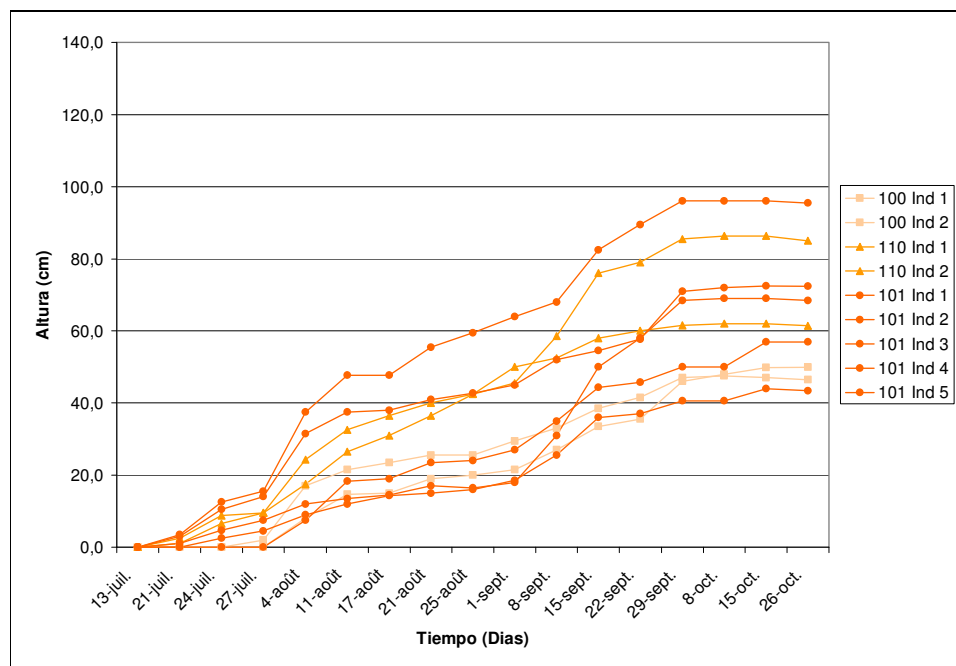
| | | NUMERO DE BROTES QUE APARECIERON EN SUPERFICIE POR DIA DE OBSERVACIÓN DESPUÉS DE LA PUESTA EN MARCHA DEL EXPERIMENTO | | | | | TOTAL DE BROTES | % sobre total de brotes plantados |
|---|---------------------------------------|--|-----|-----|-----|-----|-----------------|-----------------------------------|
| MODALIDAD | DIA | 9 | 12 | 15 | 23 | 30 | | |
| <i>MxG</i> sola (100) | Número | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 2 | 40 |
| | Total acumulado | 0 | 0 | 1 | 2 | 2 | | |
| | % sobre total de brotes en superficie | 0 | 0 | 50 | 100 | 100 | | |
| <i>MxG</i> y <i>Mycobacterium spn 11</i> (110) | Número | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 40 |
| | Total acumulado | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | | |
| | % sobre total de brotes en superficie | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | | |
| <i>MxG</i> y asociación de 6 colonias diferentes de bacterias (101) | Número | 3 | 1 | 0 | 1 | 0 | 5 | 100 |
| | Total acumulado | 3 | 4 | 4 | 5 | 5 | | |
| | % sobre total de brotes en superficie | 60 | 80 | 80 | 100 | 100 | | |

♦ Evolución de la altura de *MxG* en el tiempo. En lo que concierne al crecimiento de *Miscanthus x giganteus* en el tiempo (anexo G), los resultados presentaron una variabilidad considerable para las modalidades con bacterias; por su parte, las repeticiones de la modalidad de *MxG* sola presentó una tendencia

muy parecida en su crecimiento, con una altura final entre los 45cm y 50cm. (Figura 26)

En la figura se observa que la mayor altura alcanzada por la planta fue cercana a los 100cm, obtenida por una de las repeticiones de *MxG* en presencia de la asociación de 6 colonias diferentes de bacterias. Igualmente se constata que las plantas que se desarrollaron en presencia de material bacteriológico superaron en su mayoría la altura alcanzada por las repeticiones de *MxG* sola.

Figura 26. Evolución del crecimiento de *MxG* en suelo de la mina Carreau Wendel



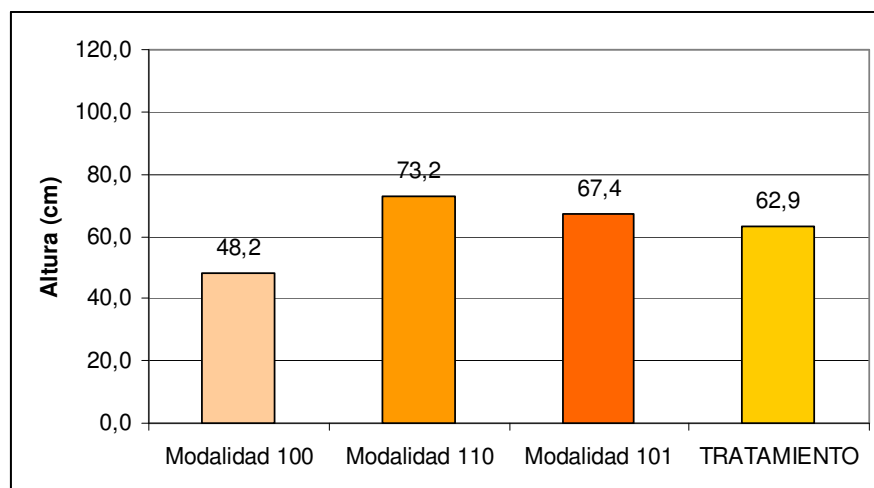
100: *MxG* sola; 110: *MxG* y Bct; 101: *MxG* y Cost

Es de mencionar también que aparentemente la altura de las plantas se estabiliza al final del periodo de experimentación; se observó además amarillamiento y secado de las hojas.

Es de mencionar que próxima a la fecha de finalización del experimento se observó que las hojas de las plantas de *Miscanthus x giganteus* presentaban secamiento de sus extremos o puntas. Esto provocó una ligera disminución en los valores registrados para la altura de las plantas al final de la experiencia.

Ahora bien, la figura 27 muestra que *Miscanthus x giganteus* en presencia de *Mycobacterium spn 11* presentó el mejor promedio en altura con 73.2cm. La altura promedio para este tratamiento fue de 62.9cm; como se notó anteriormente, la menor altura fue alcanzada por MxG sola (48.2cm).

Figura 27. Altura promedio de MxG en suelo de la mina Carreau Wendel



100: MxG sola; 110: MxG y Bct; 101: MxG y Cost

Por otra parte, es de mencionar que al final del periodo de experimentación se observó la presencia de otras especies vegetales, consideradas comúnmente en la zona del muestreo como malas hierbas o maleza, cuyas semillas estaban seguramente contenidas en el suelo de la mina en el momento de realizarse los muestreos. Sin embargo, no se llevaron registros de su aparición, ni se realizó un inventario o caracterización pertinente de las mismas.

7.3.2 Análisis físico-químico y biológico de los recipientes. En este experimento no se realizaron los de la biomasa producida por las plantas de las diferentes modalidades elaboradas; sin embargo, se encuentran en curso la identificación y descripción de las bacterias autóctonas e introducidas presentes en los suelos de la mina.

En lo que respecta a los análisis físico-químicos del suelo, estos serán complementados y verificados para una mejor interpretación de los experimentos realizados.

8. CONCLUSIONES

Durante la pasantía, se aplicaron las diferentes técnicas desarrolladas para el análisis físico-químicos de los suelos según lo estipulado en la normatividad francesa correspondiente, además de llevar a cabo la puesta en marcha y respectivo seguimiento de los dos planos experimentales diseñados con el grupo de investigación, con el fin de poner en evidencia la acción combinada de *Miscanthus x giganteus* y las bacterias del suelo sobre la remediación de terrenos industriales contaminados.

Los resultados obtenidos en los análisis de los suelos permitieron generar una descripción preliminar de algunas de las características de los suelos de la mina Carreau Wendel (acidez, humedad, textura y fertilidad)

Es un suelo de pH neutro. Sin embargo, es de notar que si bien el pH se encasilla en el intervalo de pH neutro (6.5 – 7.5), éste se acercó al límite mínimo de dicho intervalo, lo cual muestra un posible potencial de acidificación del suelo de la mina Carreau Wendel¹⁸⁴. Además, es de mencionar que según Charry¹⁸⁵ las bacterias prosperan aparentemente mejor a valores de pH comprendidos entre 5.5 y 7.5.

El contenido en materia seca y humedad encontrados muestran que el suelo de la mina contiene en promedio 1.84% de agua para la fracción a 2mm; sin embargo, no se llevaron a cabo los análisis concernientes a la densidad del suelo para conocer la humedad volumétrica¹⁸⁶, su capacidad de campo y su punto de marchitamiento¹⁸⁷.

Por otro lado, este suelo se compone principalmente de material fino (65%) y su textura es arenosa. En general, esta característica se encuentra relacionada con condiciones específicas como: percolación excesiva por la presencia de macroporos que determinan un movimiento rápido del agua, generando una poca retención de agua; circulación libre del aire que conlleva a un secamiento rápido del suelo en la parte superficial tendiendo a la oxidación intensa de la materia

¹⁸⁴ BAIZE, Op. cit. , p. 257

¹⁸⁵ CHARRY, Op. cit., p. 35

¹⁸⁶ Ibid., p. 56

¹⁸⁷ INSTITUTO GEOGRÁFICO « AGUSTÍN CODAZZI » (IGAC). Propiedades físicas de los suelos, Volumen XII, No.7. Segunda edición. Bogotá D.E.: Ministerio de Hacienda y Crédito Público, IGAC Subdirección Agrología, 1976. p. 271.

orgánica, la cual se encuentra relacionada con la poca cantidad de residuos orgánicos en ese tipo de suelo¹⁸⁸; escasa retención de elementos nutritivos, debido a su facilidad de lavado o migración de dichos elementos a estratos inferiores que presenten altos contenidos de arcilla, y por tanto estos suelos deben ser fertilizados para poder soportar cultivos adecuadamente¹⁸⁹.

En lo que concierne al contenido en nitrógeno, notamos que se presentaron algunas inconsistencias durante los análisis que no permiten afirmar con certeza la veracidad de los valores encontrados.

Ahora bien, si se tiene en cuenta que el porcentaje de materia orgánica es 20 veces el porcentaje de nitrógeno ($\% MO = \% N * 20$), y si deducimos a partir de ello el porcentaje en nitrógeno para el suelo Standard estudiado (puesto que los resultados para el análisis del carbono fueron satisfactorios), se obtiene un contenido aparente de 0.19 %N (el cual es inferior al valor encontrado según los análisis por el método Kjeldahl: 1.37 mg/g, equivalente a 1.37%). Para el suelo de la mina se obtienen valores muy similares en ambos casos: 1.08mg/g para el método Kjeldahl y 1.10 aplicando la ecuación mencionada.

Según los resultados encontrados utilizando la formula, obtenemos que los suelos de la mina tienen un contenido en nitrógeno muy alto (es decir, $\%N > 0.55$), mientras que el suelo Standard conserva valores ideales de este elemento (es decir, $0.19 < \%N < 0.36$)¹⁹⁰.

Por otra parte, los análisis realizados a través del método ANNE mostraron que el suelo de la Mina Carreau Wendel cuenta con un contenido aproximado de carbono orgánico de 12.80%, el cual es considerado como muy alto (es decir, $\%C > 6.43$); por su parte, el suelo Standard cuenta con un porcentaje de carbono de 2.21%, calificado como un nivel ideal (es decir, $2.15 < \%C < 4.2$). Igualmente, al expresar dichos valores en porcentaje de materia orgánica ($\%MO = \%C * 1.724$) se obtienen contenidos muy altos para los suelos de la mina ($\%MO > 11.10$) e ideales para el suelo Standard ($3.71 < \%MO < 7.40$)¹⁹¹.

¹⁸⁸ CHARRY, Op. cit., p. 97

¹⁸⁹ INSTITUTO GEOGRÁFICO « AGUSTÍN CODAZZI », Op. Cit., p. 283.

¹⁹⁰ MICROFERTISA. Manual técnico: investigación y experiencia en insumos agrícolas. Cuarta edición. Bogotá, D.C.: Microfertisa W.F. & CIA. Ltda., sin fecha (s.f.). p. 11.

¹⁹¹ Ibid., p. 11

Hay que resaltar que los valores de carbono orgánico obtenidos no revelan el origen de dicho elemento (ya sean HAP o ácidos húmicos por ejemplo) ni sus respectiva proporción. Por otro lado, según Baize¹⁹², un horizonte hemi-orgánico contiene más de 8% de carbono orgánico (medido a partir del método ANNE), mientras que los que presentan un porcentaje inferior son considerados horizontes organo-minerales; se podría concluir entonces que el suelo de la mina Carreau Wendel es de tipo hemi-orgánico. Charry¹⁹³ define un horizonte hémico como una turba completamente descompuesta o humificada (de ahí su fuerte coloración negra); es de recordar que el lugar donde se llevaron a cabo los muestreos corresponde a una antigua mina de carbón.

Así pues, el contenido aparente de nitrógeno y carbono de los suelos de la mina Carreau Wendel y suelo Standard son: 1.10 %N - 12.80 %C y 0.19 %N - 2.21 %C respectivamente. Al calcular la relación carbono – nitrógeno (C/N), la cual indica la naturaleza del nitrógeno en el suelo o si se presenta inmóvil o mineralizado, el índice de actividad de los microorganismos presentes en el suelo y la necesidad de aplicar fertilizantes particularmente nitrogenados¹⁹⁴, encontramos que para el suelo de la mina la relación C/N es de 11.64, y 11.63 para el suelo Standard.

Se considera que en una relación C/N inferior a 17 tiene lugar la mineralización del nitrógeno (pasa de las formas orgánicas a inorgánicas). En este caso, existe un exceso de nitrógeno; además, los residuos son de fácil descomposición o ya se han degradado. Es de notar que a medida que la relación C/N se hace más amplia (C/N > 30) los procesos de descomposición disminuyen¹⁹⁵.

En lo que se concierne a los Elementos trazas metálicos observamos que el plomo (140.78 mg/kg) y el níquel (52.66 mg/kg) fueron los elementos más sobresalientes en el suelo de la mina Carreau Wendel, presentando el mayor contenido en el suelo; estos superaron los límites permisibles para la aplicación de lodos industriales propuestos por el Arrêté du 8 janvier 1998. Es de resaltar que ambos metales generan problemas importantes sobre la salud humana; además, pueden ser absorbidos por las plantas y por tanto ser bioacumulados en el ecosistema.

¹⁹² BAIZE, Op. cit. , p. 257

¹⁹³ CHARRY, Op. cit., p. 235-236

¹⁹⁴ Ibid., p. 235-236

¹⁹⁵ Ibid., p. 235-236

Por otro lado, el porcentaje de saturación de bases (es decir la relación existente entre suma de cationes intercambiables y la capacidad de intercambio catiónico: $S/T \cdot 100$) de los suelos de la mina Carreau Wendel, aproximadamente igual a 36.29%, muestran que es un suelo aparentemente oligosaturado, en comparación al suelo Standard (89.58 % de saturación) el cual figura como subsaturado¹⁹⁶.

Todo lo anterior permitió tener una primera aproximación sobre las características generales de los suelos; sin embargo, debido a los rendimientos alcanzados para algunas de las pruebas, es necesario confirmar los resultados y complementar los análisis para una mejor descripción de los suelos de la mina Carreau Wendel. Es de mencionar que las características descritas para cada suelo analizado (de mina y Standard) son determinantes en el desarrollo de las plantas para los experimentos llevados a cabo en este trabajo de investigación.

El objetivo de los experimentos fue realizar conjeturas sobre la influencia de la planta y las bacterias sobre los contaminantes presentes en el suelo, al igual que el efecto o de los contaminantes sobre el desarrollo de dichos organismos. No obstante, debido a la duración de la pasantía, sólo se obtuvieron algunos resultados.

En lo que se refiere a los resultados obtenidos para el experimento realizado sobre el suelo Standard, se observa que el desarrollo de los brotes de *Miscanthus x giganteus* en presencia de hidrocarburos aromáticos policíclicos aparentemente podría verse afectado; este tratamiento presentó el menor porcentaje de éxito en brotes fuera de superficie (56%). En cambio, los brotes que se desarrollaron en suelos enriquecidos sólo con elementos trazas metálicos tuvieron un mejor porcentaje, siendo este de 89%.

Se observa que la modalidad 11010 (*MxG*, HAP y Bct) presentó el menor porcentaje de brotación para todo el experimento (33.3%). A excepción del caso mencionado, se constata que la presencia de *Mycobacterium spn 11* parece ayudar al desarrollo de *Miscanthus x giganteus*, o no afecta el desarrollo de los brotes de la planta; la mayoría de las modalidades que contenían esta bacteria obtuvieron los mejores porcentajes de brotación de la planta (por encima del 80%).

¹⁹⁶ BAIZE, Op. cit., p. 257

Es necesario resaltar que en el caso de *MxG* con tratamiento HAP, los mejores resultados de brotación se presentó para *Miscanthus x giganteus* en compañía de las 6 colonias diferentes de bacterias.

La evolución de la altura de *Miscanthus x giganteus* mostró que la altura potencial de la planta podría encontrarse por encima de los 120cm; no obstante, esta condición sólo se presentó en ausencia de contaminantes (HAP y/o ETM).

Al analizar los resultados para cada uno de los tratamientos elaborados en este experimento, observamos que en general las plantas que se desarrollaron en presencia de *Mycobacterium spn11* obtuvieron un mejor promedio en la altura de *MxG*, siendo este en todos los casos superior a la altura promedio alcanzada por el tratamiento correspondiente.

El tratamiento que muestra el menor crecimiento promedio de la planta fue *Miscanthus x giganteus* en presencia simultanea de HAP y ETM; por otro lado, si consideramos el promedio obtenido para la altura de *MxG* sola (96.1cm), con tratamiento HAP (93.3cm) y con tratamiento ETM (sin tener en cuenta los brotes fuera de superficie muertos en el transcurso del experimento, es decir: 98.6cm), notamos que los tres presentaron una altura muy parecida al finalizar el experimento. Lo anterior podría traducirse posiblemente en una ausencia de efectos negativos de los tratamientos HAP o ETM sobre la evolución de la altura de la planta, en comparación al tratamiento donde se encuentran los dos contaminantes al mismo tiempo en el suelo.

Si estudiamos ahora los resultados del análisis de la biomasa, constatamos que la planta tuvo un mejor desarrollo de su parte aérea para *MxG* con tratamiento HAP (4.29g, en comparación a 4.14g para *MxG* con tratamiento ETM, 4.08g para *MxG* sin tratamiento, y 3.00g para *MxG* con tratamiento HAP-ETM).

Por otra parte, en general la planta produjo mayor biomasa total (Parte aérea + raíces) para el tratamiento con HAP, y la menor correspondió al tratamiento con ETM. Es de resaltar que para los resultados del promedio por tratamiento de la relación parte aérea – raíces, notamos que *Miscanthus x giganteus* obtuvo un mejor desarrollo de sus raíces en presencia de HAP y ETM simultáneamente; en los otros casos, el desarrollo fue muy parecido.

Ahora bien, según la relación parte aérea – raíz de las modalidades que conformaban el grupo de *MxG* sin tratamiento, notamos que aparentemente existe un mejor desarrollo de las raíces para *Miscanthus x giganteus* en presencia de *Mycobacterium spn11*. No obstante, al analizar los resultados de esta relación para *MxG* con tratamiento HAP y *MxG* con tratamiento ETM, se observa que la planta tiene un mejor desarrollo del sistema de raíces cuando se encuentra acompañada de las 6 colonias diferentes de bacterias. En el caso de *MxG* con tratamiento HAP-ETM, el desarrollo máximo de las raíces se da para las plantas sin presencia de microorganismos.

Así pues, teniendo en cuenta los resultados generales del crecimiento y de la biomasa desarrollada por la planta en el transcurso del experimento, se podría considerar que *Miscanthus x giganteus* aparentemente se desarrolla satisfactoriamente en suelos contaminados con HAP; además, la presencia de bacterias capaces de degradar o resistir a dichos hidrocarburos, parece intervenir de manera positiva en el desarrollo de la planta. Lo anterior podría interpretarse como una posible relación entre la planta y las bacterias en la degradación de los HAP.

En lo que respecta a los elementos trazas metálicos, los resultados generales muestran una menor producción de biomasa total y un desarrollo aparentemente normal del sistema de raíces. Al analizar los tratamientos que incluyen dichos elementos por modalidades, los mejores valores de biomasa total y relación parte aérea – raíces fue para la que no tenía presencia de bacterias.

Para el caso de *Miscanthus x giganteus* cultivada en suelos de la mina Carreau Wendel en presencia de los diferentes tipos de bacterias (sin agregar contaminantes artificialmente en el laboratorio), se observa que la planta obtuvo un desarrollo drásticamente inferior que en el experimento anterior; esto podría atribuirse a la diferencia en las condiciones físico-químicas que existen entre ambos suelos.

Sin embargo, los resultados mostraron que el desarrollo de *Miscanthus x giganteus* fue mejor cuando se cultivó en compañía de bacterias; hubo un excelente porcentaje de brotación para el caso de las 6 colonias diferentes de bacterias (100%) y la mayor altura promedio para la planta se obtuvo en presencia de *Mycobacterium spn 11*.

Así pues, los resultados del experimento sobre el suelo de la mina parecen apoyar lo inferido del experimento anterior (suelo Standard); aparentemente existe una relación positiva entre la *Miscanthus x giganteus* y bacterias degradadoras al ser sometidas a suelos contaminados con hidrocarburos aromáticos policíclicos y elementos trazas metálicos.

Se esperan obtener los resultados del análisis sobre el contenido en HAP del suelo de la mina Carreau Wendel y la evolución de dichos hidrocarburos y los elementos metálicos al final de los experimentos, para poder generar una mejor apreciación acerca de la relación *MxG* – comunidad bacteriana en la biorremediación de suelos contaminados por estos compuestos.

Finalmente se debe resaltar que como primer estudio prospectivo de esta investigación, los resultados obtenidos fueron una base para el grupo de investigación que permite perfeccionar los planos experimentales, considerar una profundización de los análisis pertinentes de los suelos para mejores interpretaciones y generar propuestas para futuras investigaciones.

9. RECOMENDACIONES

En cuanto al análisis de suelos se considera necesario asegurar un mejor resultado para las muestras testigo que permita minimizar el margen de error, el cual se traduce en los bajos rendimientos de las metodologías aplicadas.

Igualmente, es indispensable asegurar la realización de análisis complementarios, como el análisis de otros elementos mayores como el fósforo (importante en la interpretación de la fertilidad) para una mejor interpretación y comparación de las características del suelo. Se resalta también que en algunas ocasiones es necesario tener un mayor número de repeticiones por muestra para así obtener mejores resultados estadísticos de las pruebas.

Por otro lado, se recomienda realizar una caracterización general del contenido en microorganismos autóctonos a los suelos de la mina Carreau Wendel, con el objetivo de conocer si existe o no una verdadera actividad microbiana y más aún, organismos posiblemente específicos o resistentes a la degradación del tipo de contaminantes utilizados en los experimentos. Lo anterior permitiría trabajar en un futuro con las poblaciones existentes en el lugar, mejorando aún más los procesos de biorremediación aplicados. Se debe mencionar que a la presente, el grupo de investigación esta adelantando esfuerzos en este aspecto, además de la identificación de las 6 colonias diferentes de bacterias utilizadas en ambos experimentos.

Ahora bien, en el caso de los experimentos realizados con *Miscanthus x giganteus* y las diferentes comunidades bacterianas sobre suelos contaminados, es inevitable resaltar que se presentó una variabilidad muy amplia en el número de réplicas por modalidad para cada uno de los tratamientos y por tanto es justo tener en cuenta dicha debilidad en futuros experimentos (procurar asegurar una mejor homogeneidad en el estado inicial de los brotes, o realizar un adecuado seguimiento de los mismos durante el periodo de estudio) con el fin de obtener resultados que permitan realizar un mejor análisis estadístico y afirmar con más seguridad los resultados deducidos en esta primera aproximación experimental.

En los estudios de Rivera-Cruz y Trujillo¹⁹⁷, se observa que las variables escogidas para el estudio de la toxicidad vegetal en los suelos con petróleos nuevo e intemperizado fueron: germinación (considerándose este como brotación en el caso de los rizomas en gramíneas), altura, longitud de raíz, biomasa (aérea, de raíz y total) y número de nódulos en las plántulas (en esta investigación se utilizaron especies de gramíneas). Por lo tanto, se sugiere realizar no solo la determinación de la biomasa del sistema de raíces sino también la longitud de las mismas con el fin de evaluar la reducción en su crecimiento debido al estrés por contaminantes; es de considerarse que esta es una planta con un tamaño imponente (4 metros de alto aproximadamente) y por tanto necesita un buen anclaje al suelo, el cual es proporcionado principalmente por las raíces.

Por otro lado, en el momento de calcular la biomasa aérea de las plantas, se recomienda hacer una discriminación de la cantidad producida por la planta principal y la de los brotes secundarios, puesto que esto permitiría complementar los resultados obtenidos al comparar la producción en biomasa del brote plantado y el desarrollo de la planta a lo largo del periodo de estudio, de acuerdo al tipo de tratamiento aplicado.

Es de recordar que el estado inicial de los brotes al ser plantados no fue registrado, es decir que no se tuvo constancia de las modalidades cuyos brotes no cumplían con el ideal propuesto para la investigación; lo anterior podría tener una influencia en el desarrollo de dichos brotes. Por lo tanto, se debe hacer un registro de la apariencia y peso del brote antes de ser plantado, identificando el tratamiento y la modalidad respectivos.

Además, si se espera conocer con más detalle el efecto de los contaminantes sobre la planta, sería conveniente realizar experiencias con concentraciones diferentes para dichos contaminantes para observar la respuesta de la planta (si se desea en conjunto con los microorganismos) ante cada uno de los casos preparados.

En el momento, el grupo de investigación también adelanta estudios más profundos sobre las características específicas de los exudados de provenientes de las raíces de *Miscanthus x giganteus*, y su efecto potencial para las comunidades bacterianas en el suelo.

¹⁹⁷ RIVERA-CRUZ, M. del C. y TRUJILLO-NARCIA, A. Estudio de toxicidad vegetal en suelos con petróleos nuevo e intemperizado. En: Interciencia (INCI). Vol. 29, No. 7 (2004); p. 369-376.

BIBLIOGRAFIA

ASSOCIATION FRANÇAISE DE NORMALISATION (AFNOR). Qualité des sols – Échantillonnage. Norme X 31-100, 1992. 8 p.

-----. Qualité des sols – Analyse granulométrique par sédimentation, méthode de la pipette. Norme X 31-107, 1993. 15 p.

-----. Qualité des sols – Détermination de la capacité d'échange cationique (CEC) et des cations extractibles. Norme X 31-130, 1993. 14 p.

-----. Qualité des sols – Détermination du carbone organique par oxydation sulfochromique. Norme NF X 31-109, 1993. 7 p.

-----. Qualité des sols – Détermination de la teneur pondérale en matière sèche et en eau. Norme NF ISO 11465, 1994. 4 p.

-----. Qualité des sols - Détermination du pH. Norme NF ISO 10390, 1994. 3 p.

-----. Qualité des sols - Prétraitement des échantillons pour analyses physico-chimiques. Norme NF ISO 11464, 1994. 6 p.

-----. Qualité des sols – Dosage de l'azote total. Norme NF ISO 11261, 1995. 3 p.

-----. Qualité des sols – Extraction des éléments en trace solubles dans l'eau régale. Norme NF ISO 11466, 1995. 5 p.

-----. Qualité du sol – Vocabulaire – Partie 1 : Termes et définitions relatifs à la protection et à la pollution des sols. Norme NF ISO 11074-1, 1997. 23 p.

ALLARD A.S., MALMBERG M., NEILSON A.H., y REMBERGER M. Accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons from creosote-contaminated soil in selected plants and the oligochaete worm *Enchytraeus crypticus*. En: Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng. Vol. 40, No. 11 (2005); p. 2057-2072.

AMELLAL, S. Biodégradation, mobilité et stabilisation du phénanthrène dans deux sols agricoles Lorraine, 2004. 163 p. Tesis Doctoral: Sciences Agronomiques. L'Institut National Polytechnique de Lorraine en Sciences Agronomiques.

ARDUINI, I., MASONI, A., MARIOTTI, M., y ERCOLI, L. Low cadmium application increase miscanthus growth and cadmium translocation. En: Environmental and experimental botany. Vol. 52 (2004); p. 89-100.

BAIZE, D. Guide des analyses en pédologie. Edition n°2. Paris : INRA Editions, 2000. 257 p. ISBN 2-7380-0892-5.

BAKER, R., GHAEMGHAMI, J., SIMKINS, J., y MALLORY, L., CITES PAR ALLEMAN ET AL., Hydrocarbon biorremediation. United States: CRC Press, 1994. 496 p. ISBN 087-37-19840.

BAUMARD, P., BUDZINSKI, H., y GARRIGUES, P. Polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments and mussels of the western méditerranean sea. En: Environmental Toxicology and Chemistry. Vol. 17, No. 5 (1998); p. 765-776.

BINET, Ph., PORTAL, J.M. y LEYVAL, C. Fate of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in the rhizosphere and mycorrhizosphere of ryegrass. En: Plant and soil. Vol. 227 (2000); p. 207-213.

BLONDEL, T. Pollution souterraine : paramètres et paramétrage des modèles en écoulement et en transport des polluants [en línea]. France : Cabinet conseil BLONDEL, Septiembre, 2001. [consultado 09 de Octubre de 2006]. Disponible en Internet : <http://www.ccblondel.com/html/accueil.htm>

BLUMER, M. y YOUNGBLOOD, W. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soils and Recent Sediments. En: Revue Science. Vol. 188, No. 4183 (1975); p. 53-55.

BOUCHEZ M., BLANCHET D., HAESELER F., y VANDECASTEELE J.P. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques dans l'environnement. Propriétés, origines, devenir. En: Revue de l'institut français du pétrole. Vol. 51, No. 3 (1996); p. 407 – 419.

----- Les hydrocarbures aromatiques polycycliques dans l'environnement. Dégradation par voie microbienne. En: Revue de l'institut français du pétrole. Vol 51, No. 6 (1996); p. 797-828.

BOUVIER, D. Structure et dynamique moléculaires en biologie [en línea]. France: ARPe-Biochimie Université Paris 6, 06 de Sept., 1999. [consultado 09 de Octubre de 2006]. Disponible en Internet : <http://www.snv.jussieu.fr/enseignement/ARPE/td/pol.html>

BRADY, N.C, y WEIL, R.R. The nature and properties of soils. Editions N°13. United States of America: Pearson Education Inc., 2002. 960 p. ISBN 0-13-016763-0.

BROWN, J.D. Doing second language research. Oxford: Oxford University Press, 2002. XIV. 314 p. : il. (Oxford Handbook for language teachers). 0-19-437174-3.

BRUXELLES ENVIRONNEMENT. Assainissement ex-situ « off site » [en línea]. Belgique, Bruxelles: 15 de Marzo, 2006. [consultado 07 de Septiembre de 2006]. Disponible en Internet: <http://www.ibgebim.be/francais/contenu/content.asp?ref=1168>

BURGHARDT U. Le Carreau Wendel : historique, état actuel et programmation du projet [en línea]. Congrès national des sociétés historiques et scientifiques, Nancy: 18 de Abril, 2002. [consultado 15 de junio de 2006]. Disponible en Internet: http://www.cths.fr/4DACTION/www_Con_Communic/1110

CHANG, B.V., SHIUNG, L.C., y YUAN, S.Y. Anaerobic biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon in soil. En: Chemosphere. Vol. 48, No. 7 (2002); p. 717-724.

CHARRY, J. Naturaleza y propiedades físicas de los suelos. Palmira: Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agropecuarias, 1987. 382 p.

CHAUDHRY, Q., BLOM-ZANDSTRA, M., GUPTA S., y JONER, E.J. Utilising the synergy between plants and rhizosphere microorganism to enhance breakdown of organic pollutants in the environment (Review articles). En: Environ Sci & Pollut Res. Vol. 12, No. 1 (2005); p. 34-48.

CORGIE, C., JONER, E.J. y LEYVAL, C. Rhizospheric degradation of phenanthrene is a function of proximity to roots. En: Plant Soil. Vol. 257, No. 1 (2003); p. 143-150.

Diccionario de química y de productos químicos. Barcelona: Ediciones Omega S.A., 1985. 919 p.

DIONISI, H. Potencial de biorremediación intrínseca de hidrocarburos aromáticos policíclicos en sedimentos marinos [en línea]. Laboratorio de Microbiología ambiental, Unidad de Investigación de Oceanografía y Meteorología CENPAT-CONICET: Enero, 2006. [consultado 17 de Abril de 2006]. Disponible en Internet: http://www.cenpat.edu.ar/fisicambien/microb_amb.htm

DOMÉNECH, X. Química Ambiental: el impacto ambiental de los residuos. 2 ed. Madrid: Miraguano ediciones, 1994. 254 p. ISBN 84-7813-109-4.

ECOFOX. Bioremédiation In Situ [en línea]. Belgique: 21 de Feb, 2006. [consultado 04 de Septiembre de 2006]. Disponible en Internet: <http://www.ecofox.com/bioremediation.html>

ENTREVISTA con Dominique Morlot, Jefe del Departamento Genio en Biología I.U.T. de Thionville/Yutz. Yutz, 19 de Septiembre de 2006.

ENTREVISTA con Dominique Morlot, Jefe del Departamento Genio en Biología I.U.T. de Thionville/Yutz. Yutz, 05 de Octubre de 2006.

ENTREVISTA con Jairo Falla, Director grupo de Investigaciones I.U.T. de Thioville/Yutz. Yutz, 02 de Mayo de 2006.

ENTREVISTA con Philippe Arnoux, Ingeniero de Estudios del Equipo Técnico del I.U.T. de Thionville/Yutz. Yutz, 30 de Agosto de 2006.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). A citizen's guide to bioremediation [en línea]. Etats Unit: Abril, 1996. [consultado 04 de Septiembre de 2006]. Disponible en Internet:

<http://www.epa.gov/tio/download/citizens/bioremediation.pdf#search=%22biorem%C3%A9diation%22>

ENVIRONMENTAL REMEDIATION SCIENCES. General information: Glossary [en línea]. United States, 2006. [consultado 07 de Septiembre de 2006]. Disponible en Internet: <http://www.lbl.gov/ERSP/generalinfo/glossary.html>

EWEIS J.B. ET AL. Principios de biorrecuperación: tratamientos para la descontaminación y regeneración de suelos y aguas subterráneas mediante procesos biológicos y físico-químicos. Madrid: McGraw-hill, 1999. 327 p. ISBN: 84-481-2511-8.

FEDERAL REMEDIATION TECHNOLOGIES ROUNDTABLE. Remediation technologies screening matrix and reference guide. 4th edition [en línea]. Etats Unit, Virginia: Janvier, 2002. [consultado 11 de Septiembre de 2006]. Disponible sur Internet : <http://www.frtr.gov/matrix2/section4/4-2.html>

GABET, S. Remobilisation d'Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) présents dans les sols contaminés à l'aide d'un tensioactif d'origine biologique. Limoges, 2004. 186 p. Tesis Doctoral: Chimie et Microbiologie de l'Eau. Université de Limoges. Facultad de Sciences et Techniques.

GREENPEACE INTERNACIONAL. Hidrocarburos aromáticos policíclicos [en línea]. Amsterdam: Greenpeace International, 2006. [consultado 10 de Febrero de 2006]. Disponible en Internet:

<http://archivo.greenpeace.org/informes/Hidrocarburos.pdf>

GIUFFRÉ, L., RATTI, S., MARBAN, L. et al. Riesgo por metales pesados en horticultura urbana. En: Cienc. Suelo. Vol. 23, No. 1 (jan-jul. 2005); p.101-106.

HENNER, P., SCHIAVON, M., MOREL, J.L., y LICHTFOUSE, E. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) occurrence and remediation methods. En: Analisis. Vol. 25, No. 9-10 (1997); p. 56-59.

HODKINSON, T., y RENVOIZE, S. Nomenclature of *Miscanthus x giganteus*. En: Kew Bulletin (Norwich). Vol. 56, No. 3 (2001); p. 759.

HODKINSON, T., CHASE, M., y RENVOIZE, S. Characterization of a genetic resource collection for *Miscanthus* (Saccharinae, Andropogoneae, Poaceae) using AFLP and ISSR PCR. En: Annals of Botany. Vol. 89 (2002); p. 627-636.

INSTITUTO GEOGRÁFICO « AGUSTÍN CODAZZI » (IGAC). Propiedades físicas de los suelos, Volumen XII, No.7. Segunda edición. Bogotá D.E.: Ministerio de Hacienda y Crédito Público, IGAC Subdirección Agrología, 1976. 576 p.

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE (INRA). Prescription techniques applicables aux épandages de boues sur les sols agricoles. [Arrêté du 8 janvier 1998](#).

INSTITUT NATIONAL DE RECHERCHE SUR LES EAUX. Certificate of analysis: WQB-3, a lake Ontario blended sediment for trace elements. Canada: August, 2001. 3 p.

INSTITUT UNIVERSITAIRE DE TECHNOLOGIE THONVILLE YUTZ (I.U.T.). Situation-adresse. Yutz: 2006 [consultado 25 Noviembre de 2006]. Disponible en Internet: http://www.iut.univ-metz.fr/article.php3?id_article=148

JONES, L. RHS Plant trials and awards: *Miscanthus*. En: Royal horticultural society. Bulletin number 7 (2004); p. 3-5.

KALEMBASA, D., VANHOLD, N., y MALINOWOSKA, E. The changes of the cadmium and lead content of the biomass *Miscanthus* grass depending upon the clones and term of sampling. Cracow (Poland): Proceeding of the international conference of bioremediation of soil and groundwater, 2004. 149-153 p.

KOZDROJ, J. y DIRK VAN ELSAS, J. Response of the bacterial community to root exudates in soil polluted with heavy metals assessed by molecular and cultural approaches. En: Soil biology and biochemistry. Vol. 32 (2000); p. 1405-1417.

KRATZ B. Première mise en terre du miscanthus à Petite – Rosselle. En: Journal Le Républicain Lorrain, Lorraine (18, Mar., 2006) ; p. 23.

LABORATOIRE DE PHYSICOCHIMIE DES METAUX EN BIOLOGIE (PMB). Le peroxyde d'hydrogène : détection, élimination, utilisation [en línea]. France, Paris: Direction des sciences du vivant, 25 Oct., 2006. [consultado 7 de Noviembre de 2006]. Disponible en Internet : http://www-dsv.cea.fr/content/cea/d_dep/d_drdc/d_pmb/theme2.htm#anchor-PerP

LANDWIRTSCHAFTLICHE UNTERSUCHUNGS-UND FORSCHUNGSANSTALT (LUFÄ). Analysis data sheet for standard soils (A3) according to GLP. Allemagne: Mai 22, 2006. 1 p.

LASON, B., MANCEAU, A., MARCUS, M., JAILLARD, B., HINSINGER, P., NITSCHÉ, S., y BARONNET, A. Immobilisation du zinc dans la rhizosphère de végétaux métallo-tolérants : Caractérisation structurale des phases nanocristallines néoformées [en línea]. France: Institute National des Sciences de l'Univers (INSU–CNRS), 2006. [consultado 15 de Octubre de 2006]. Disponible en Internet: <http://www.insu.cnrs.fr/web/article/art.php?art=1759>

LENNTECH. Propiedades químicas del níquel, efectos del níquel sobre la salud humana, efectos ambientales del níquel [en línea]. Holanda: Lenntech agua residual & purificación del aire Holding B.V., 2005. [consultado 17 de Octubre de 2006]. Disponible en Internet: <http://www.lenntech.com/espanol/tabla-peiodica/Ni.htm>

LOVELOCK, J. Gaia: una ciencia para curar el planeta. Barcelona: Ed. Oasis, 1992. 192 p.

MAIRIE DE FORBACH. Plan de la Ville [en línea]. France, Forbach: 2006. [consultado 15 Junio de 2006]. Disponible en Internet <http://www.mairie-forbach.fr/Forbach.pdf>

MCGRATH S. P., BROOKES P. C., y GILLER K. E. Effects of potentially toxic metals in soil derived from past applications of sewage sludge on nitrogen fixation by *Trifolium repens* L. En: Soil biology and biochemistry. Vol. 20, No. 4 (1988); p. 415-424.

MENKE, A. MUNTNER, P., BATUMAN, V., SILBERGELD, E.K., y GUALLAR, E. Blood lead below 0.48 micromol/L (10 microg/dL) and mortality among US adults. En: Circulation. Vol. 114, No.13 (2006); p. 1388-1394.

MICROFERTISA. Manual técnico: investigación y experiencia en insumos agrícolas. Cuarta edición. Bogotá, D.C.: Microfertisa W.F. & CIA. Ltda., (s.f.). 100 p.

MINISTERE GENERAL DE COOPERATION ECONOMIQUE ET DEVELOPEMENT (BMZ). Manuel sur l'environnement Volume III: Catalogue des normes antipollution. Alemania: GTZ, 1996. 397 p. ISBN: 3-528-02316-3.

MINISTERIO DE AMBIENTE DE ECUADOR. Texto unificado de legislación secundaria del Ministerio de Ambiente [en línea]. Edición Especial No. 2 del Registro Oficial (Decreto Ejecutivo 3516): 31 de Marzo, 2003. [consultado 15 de Abril de 2006]. Disponible en Internet: <http://www.efficacitas.com/index.php?codigo=04LFShJc3j>

MINISTERIO DE MINAS Y ENERGÍA DE COLOMBIA. Hidrocarburos [en línea]. Bogotá, 2006 [consultado 20 de Marzo de 2006]. Disponible en Internet: <http://www.minminas.gov.co/minminas/pagesweb.nsf?opendatabase>

MINISTRE DES APPROVISIONNEMENTS ET SERVICES CANADA. Liste des substances d'intérêt prioritaire, rapport d'évaluation : Hydrocarbures aromatiques polycycliques ». Loi canadienne sur la protection de l'environnement, NATIONAL PRINTERS (OTTAWA) INC., 1994. 76 p. ISBN 0-662-99956-8.

MOHAMED, E. Z. y CHAMBON, C. Contribution à la définition d'une norme des sites pollués. Elaboration d'une méthodologie pour l'évaluation de la contamination d'un sol par éléments traces. Vandoeuvre-lès-Nancy, 1998. 196 p. Tesis Doctoral. Institut national polytechnique de Lorraine.

NAIDU, S., AL-SHOABI, A. y LONG, S.P. Cold tolerance of C4 photosynthesis in *Miscanthus x giganteus*. Queensland, Australia: PS2001, Proceedings of the 12th International Congress on Photosynthesis, Brisbane Convention & Exhibition Centre, August 18-23, 2001. 153 p.

NAIDU, S.L., MOSSE, S.P., AL-SHOAIBI, A.K., RAINES, C.A. y LONG, S.P. Cold tolerance of C4 photosynthesis in *Miscanthus x giganteus*: adaptation in amounts and sequence of C4 photosynthetic enzymes. En: Plant physiology. Vol. 132, No. 3 (2003); p. 1688-1697.

NAIDU, S.L., y LONG, S.P. Potential mechanisms of low-temperature tolerance of C4 photosynthesis in *Miscanthus x giganteus*: an in vivo analysis. En: Planta. Vol. 220, No. 1 (2004); p. 145-155.

ORTINEZ, O., IZE, I, y GAVILÁN A. La restauración de suelos contaminados con hidrocarburos en México. En: Gaceta Ecológica – INE Semarnat México. Vol. 096 (2003); p. 83-92.

ORTIZ, R. Aspectos en la contaminación del suelo por hidrocarburos en México [en línea]. Monografías.com: 1997 [consultado 22 de Marzo de 2006]. Disponible en Internet: <http://www.monografias.com/trabajos7/hime/hime2.shtml>

PARRISH Z.D., WHITE, J.C., ISLEYEN M., GENT, P.N., IANNUCCI-BERGER, W., EITZER, B.D., KELSEY, J.W. y INCORVIA, M. Accumulation of weathered polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by plants and earthworm species. En: Chemosphere. Vol. 11, No. 003 (2005); p 1-10.

PEÑA, A., MORALES, J., LABASTIDA, C., y CAPELLA, S. Extracción en fase sólida como una alternativa para el procedimiento de limpieza en la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos por cromatografía de gases: aplicación a organismos marinos. En: Revista internacional de contaminación ambiental. Vol 19, No. 001 (2003); p. 13-23.

PLAIS J.M. Une mine de documents sur la glaisière de Limay - Dosage des minéraux carbonatés [en línea]. France: Académie de Versailles, Banque de données, octubre de 1997. [consultado 20 de Septiembre de 2006]. Disponible en Internet:

http://www.acversailles.fr/pedagogi/svt/docpeda/banques/Limay/docs/ana_chim.htm#debut

READMAN, J.W., MANTOURA, R.F.C., RHEAD, M.M. y KETTRUP, A.A. Aquatic distribution and heterotrophic degradation of PAH in the Tamer estuary. En: Estuarine Coastal and Shelf Science. Vol. 14 (1982); p. 311-321.

RIVERA-CRUZ, M. del C. y TRUJILLO-NARCIA, A. Estudio de toxicidad vegetal en suelos con petróleos nuevo e intemperizado. En: Interciencia (INCI). Vol. 29, No. 7 (2004); p. 369-376.

SALINAS, J.G., SANZ, J.I., VALENCIA, C.A., y FUENTES DE PIEDRAHITA, C.L. Guía de estudio: Síntomas de deficiencia de micronutrientes y de toxicidades minerales en pastos tropicales. Colombia, Cali: CIAT, 1981. 28 p. Serie 04SP-02-02

SCURLOCK, J. M. O. *Miscanthus*: Review of European experience with a novel energy crop. U.S.A.: Oak Ridge National Laboratory, Environmental Sciences Division Publication No. 4845, February 1999. 57 p.

SECRETARIA DE COMERCIO Y FOMENTO INDUSTRIAL DE MÉXICO. Protección al ambiente – Contaminación del suelo – Residuos sólidos municipales – Determinación de Materia orgánica. Norma Mexicana NMX-AA 021 (1985); 6 p.

SHUTTLEWORTH, K. y CERNIGLIA C.. Environmental aspects of PAH biodegradation. En: Biochemistry and biotechnology. Vol. 54 (1995); p. 291-302.

SPRIGGS, Thomas; BANKS, M. Catherine y SCHWAB, Paul. Phytoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons in manufactured gas plant-impacted soil [en línea]. Journal of Environmental Quality: Madison, Sep/Oct 2005. Vol. 34, Iss.5. 1755p. [consultado 1 abril, 2006]. Disponible en Internet: <http://proquest.umi.com/pqdweb?did=909235931&sid=6&Fmt=3&clientId=53958&RQT=309&VName=PQD>

SUDIP, S., OM, S., y RAKESH, J. Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. En: Trends in biotechnology. Vol. 20, No. 6 (2002); p. 243-248.

TARRADELLAS, J., BITTON, G., y ROSSEL, D. Soil ecotoxicology. United States of America: Lewis Publishers (CRC Press), 1997. 176 p. ISBN : 1-56670-134-1.

UNION REGIONALE DES CONSEILS D'ARQUITECTURE D'URBANISME ET DE L'ENVIRONNEMENT DE LORRAINE (URCAUE). Carte de Lorraine, France [en línea]. Metz : Departement de la Moselle, 2006. [consultado 25 de Noviembre de 2006]. Disponible en Internet: www.urcaue-lorraine.com/img/illu/carteFrAcc.jpg

VOIGT, T., y PYTER, R. *Miscanthus X Giganteus* Propagation Studies [en línea]. United States, Illinois : Convention Center, Exhibit Hall ABC, 8 Nov., 2005, [consultado 10 de septiembre de 2006]. Disponible en Internet : <http://crops.confex.com/crop/2005am/techprogram/P6643.htm>.

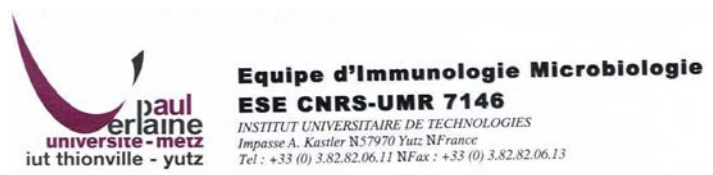
YAMAN, M. Comprehensive comparison of trace metal concentrations in cancerous and non-cancerous human tissues. En: Current medicinal chemistry. Vol. 13, No. 21 (2006); p. 2513-2525.

ZHANG, M.K., HE, Z.L., CALVERT, D.V., STOFFELLA, P.J., YANG, X.E. y LI, Y.C. Phosphorus and heavy metal attachment and release in sandy soil aggregate fractions. En: Soil science society of america journal. Vol. 67 (2003); p. 1158-1167.

ANEXOS

Anexo A. Certificados del IUT Thionville/Yutz, Universidad Paul Verlaine (Metz, Francia)

- *Certificados de pasantía*



Yutz, le mardi 14 novembre 2006

Madame, Monsieur,

Je soussigné, Dr. HDR. Professeur Jairo FALLA, Directeur de l'équipe d'Immunologie-Microbiologie à l'IUT de Thionville/Yutz, certifie que Mademoiselle Claudia Patricia Martinez Choïs, a réalisé au sein de mon Equipe de recherche un stage de six mois (Mai- Novembre 2006), sur le thème : « Bioremédiation des sols pollués par des HAP et des éléments traces métalliques à l'aide de *Miscanthus x giganteus* et un consortium bactérien ».

Tout au long du stage, Mademoiselle Martinez Choïs, a manifesté un vif intérêt pour le sujet proposé. Elle a su appliquer les techniques développées au sein de notre structure, afin de mettre au point un plan d'expériences, pour la mise en évidence de l'action combinée de MxG et des bactéries du sol sur la remédiation des friches industrielles polluées. Melle Martinez Choïs a acquis de compétences dans la caractérisation des sols et l'évaluation des polluants organiques et inorganiques.

Pendant cette période, Melle Martinez Choïs, a aussi acquis des connaissances théoriques et pratiques en préparation et culture de rhizomes, suivi des cultures expérimentales, développement de méthodes d'analyse chimique (chimie analytique classique, absorption atomique, HPLC), traitement des données etc.

Ce travail a fait l'objet d'un mémoire composé d'une introduction, une analyse bibliographique (64 références), matériel et méthodes, résultats et conclusion. Une présentation publique a été réalisée à l'oral devant jury le 15 Novembre 2006

Pour faire valoir ce que de droit.

Je vous prie de croire, Madame, Monsieur, à l'expression de mes salutations distinguées.


Dr. HDR. Pr. Jairo FALLA
Genie Biologique

- *Certificados de sustentación*



RAPPORT APRES SOUTENANCE

Sur le stage ayant pour sujet :

« Bio-remédiation des sols pollués par des HAP et des éléments traces métalliques à l'aide de *Miscanthus x giganteus* et un consortium bactérien »

Mademoiselle Claudia Patricia Martinez Chois a soutenu son rapport de stage le mercredi 15 Novembre 2006 sur le thème :

« Bio-remédiation des sols pollués par des HAP et des éléments traces métalliques à l'aide de *Miscanthus x giganteus* et un consortium bactérien »

La stagiaire a présenté son travail expérimental au cours d'un exposé de très bonne qualité au travers d'une présentation structurée révélant une démarche scientifique cohérente. Après avoir clairement exprimé ses objectifs, l'orateur a montré l'intérêt de l'utilisation de *Miscanthus x giganteus* et des souches bactériennes pour la remédiation des sols pollués aboutissant à la démonstration complète de ses objectifs. L'ensemble a été largement soutenu par une iconographie bien choisie, faisant preuve du souci didactique.

Philippe Laval-gilly
Professeur assistant

Jury

Dominique Morlot
Professeur agrégé
Jairo Falla
Professeur

UNIVERSITE DE METZ
INSTITUT UNIVERSITAIRE DE TECHNOLOGIE
DE THIONVILLE - YUTZ
Département Génie Biologique
Espace Cormontaigne - 57970 YUTZ
Tel. 03 82 82 06 11 - Fax 03 82 82 01 13
Site internet : www.iut.univ-metz.fr

Anexo B. Caracterización del suelo Standard No. A3¹⁹⁸

Características generales del suelo estándar No. A3

| ANÁLISIS | Carbón orgánico | Partículas < 0.02 mm en % | pH-valor (0.01 M CaCl ₂) | CEC (mval / 100g) | Capacidad de retención de agua (g/100g) | Peso por volumen (g/1000mL) |
|-----------------------|-----------------|---------------------------|--------------------------------------|-------------------|---|-----------------------------|
| Suelo Estándar no. 3A | 2.19 ±0.08 | 37,3 ±3.5 | 7.2 ±0.1 | 19 ± 5 | 49.6 ± 5.3 | 1120 ± 84 |

Tamaño de las partículas (mm) del suelo estándar No. A3: Distribución DIN alemana (%)

| Partículas | <0.002 | 0.002 - 0.006 | 0.006 - 0.02 | 0.02 - 0.063 | 0.063 - 0.2 | 0.2 - 0.63 | 0.63 - 2.0 |
|-----------------------|------------|---------------|--------------|--------------|-------------|------------|------------|
| Suelo Estándar no. 3A | 17,9 ± 1.4 | 7.1 ± 1.1 | 12.8 ± 1.6 | 21.2 ± 2.7 | 31.1 ± 3.0 | 8.8 ± 1.0 | 1.2 ± 0.3 |

Tipo de suelo: Arenoso con arcilla y barro (uIS)

Tamaño de las partículas (mm) del suelo estándar No. A3: Distribución USDA (%)

| Partículas | <0.002 | 0.002 - 0.05 | 0.05 - 2.0 | Tipo de suelo |
|-----------------------|------------|--------------|------------|----------------------------|
| Suelo Estándar no. 3A | 18.0 ± 1,5 | 35,5 ± 2.2 | 46.5 ± 3.3 | Tierra de textura plástica |

¹⁹⁸ LANDWIRTSCHAFTLICHE UNTERSUCHUNGS-UND FORSCHUNGSANSTALT (LUFA). Analysis data sheet for standard soils (A3) according to GLP. Allemagne: Mai 22, 2006. p. 1.

Anexo C. Descripción de la antigua mina de carbón Carreau Wendel

El Carreau Wendel es una antigua mina de carbón que puso fin a sus actividades en el año de 1986, después de 120 años de extraer millones de toneladas de carbón del subsuelo; hoy en día, el gobierno ha instaurado en sus territorios una ciudad-museo que permite conocer la historia de un terreno completamente transformado por el ser humano. (Burghardt, 2002)

Se considera que puede presentarse una alta probabilidad de contaminación por hidrocarburos aromáticos policíclicos debido a la existencia de un destilador de hulla sobre los terrenos de la mina; es de resaltar que este proceso es una fuente potencial de emisiones de HAP en el medio ambiente (Entrevista con Dominique Morlot, 2006).

Por otro lado, es de mencionar que el 17 de mayo de 2006, un cultivo de *Miscanthus x giganteus* fue lanzado sobre una parcela de 60 acres en los terrenos de la mina (Kratz, 2006) con ayuda del Lycée Agricole de Courcelles Chaussy, en presencia del alcalde de Forbach y del equipo de Inmunología-Microbiología del I.U.T. de Thionville/Yutz.

Anexo D. Detalle de los resultados obtenidos para los análisis de suelo de la mina Carreau Wendel

- *pH del suelo de la mina Carreau Wendel:*

| Muestra | | pH | |
|---------------------|----------------|------------------|------|
| | | H ₂ O | KCl |
| Suelo de Mina | F ₁ | 7,00 | 6,59 |
| | F ₂ | 7,00 | 6,61 |
| | F ₃ | 6,92 | 6,65 |
| Promedio | | 6,97 | 6,62 |
| Desviación estándar | | 0.05 | 0.03 |

- *Contenido en materia seca y agua del suelo de la mina Carreau Wendel:*

| Muestra | | m ₀ (g) | m ₁ (g) | m ₂ (g) | Wdm (%) | WH ₂ O (%) |
|---------------------|----------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------|-----------------------|
| Fracción < 2mm | F ₁ | 60,96 | 71,20 | 71,01 | 98,16 | 1,88 |
| | F ₂ | 62,33 | 72,67 | 72,49 | 98,20 | 1,83 |
| | F ₃ | 61,96 | 72,18 | 72,00 | 98,22 | 1,81 |
| Promedio | | 61,75 | 72,02 | 71,83 | 98,19 | 1,84 |
| Desviación estándar | | 0,71 | 0,75 | 0,75 | 0,03 | 0,04 |
| Fracción < 200µm | f ₁ | 61,05 | 71,39 | 71,22 | 98,37 | 1,66 |
| | f ₂ | 62,32 | 72,33 | 72,16 | 98,34 | 1,69 |
| | f ₃ | 62,01 | 72,01 | 71,85 | 98,36 | 1,67 |
| Promedio | | 61,79 | 71,91 | 71,74 | 98,36 | 1,67 |
| Desviación estándar | | 0,66 | 0,48 | 0,48 | 0,02 | 0,02 |
| Fracción >2mm | G ₁ | 24,15 | 25,29 | 25,27 | 98,21 | 1,82 |
| | G ₂ | 24,32 | 25,49 | 25,47 | 99,05 | 0,96 |
| | G ₃ | 23,03 | 24,18 | 24,17 | 98,73 | 1,29 |
| Promedio | | 23,83 | 24,99 | 24,97 | 98,66 | 1,36 |
| Desviación estándar | | 0,70 | 0,71 | 0,70 | 0,42 | 0,43 |

Convenciones

| | |
|-------|--|
| m_0 | masa (g) del recipiente vacío con su respectiva tapa |
| m_1 | masa (g) del recipiente con la muestra de suelo secada al aire |
| m_2 | masa (g) del recipiente con la muestra de suelo secada a 105°C |

Formula,

$$W_{H_2O} = \frac{m_1 - m_2}{m_2 - m_0} \times 100 \quad W_{dm} = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \times 100$$

- *Contenido de nitrógeno total del suelo de la mina Carreau Wendel:*

| Muestra | | masa de la muestra (g) | V_{eq} (mL) | W_N (mg/g) |
|----------------------------|----------------|------------------------|---------------|---------------|
| Blanco | | — | 0,6000 | |
| $(NH_4)_2SO_4$ | | 1mL | 3,2000 | 0,7280 |
| Acetanilida | | 1mL | 3,9500 | 0,9380 |
| Suelo de mina | F ₁ | 0,1999 | 1,3500 | 1,0500 |
| | F ₂ | 0,2033 | 1,4000 | 1,1020 |
| Promedio | | 0,2016 | 1,3750 | 1,0760 |
| Desviación estándar | | 0,0024 | 0,0354 | 0,0368 |
| Suelo Standard | | 0,2045g | 1,6000 | 1,3690 |

Convenciones,

V_{eq} Volumen equivalente de ácido sulfúrico utilizado en la titulación

Formula,

$$W_N = \frac{(V_1 - V_0) \cdot c(H^+) \cdot M_N}{m_p} \cdot \frac{100 + W_{H_2O}}{100}$$

Donde,

V_1 Volumen, en ml, de ácido sulfúrico utilizado para la titulación de la muestra
 V_0 Volumen, en ml, de ácido sulfúrico utilizado para la muestra blanco
 $c(H^+)$ 0,02 mol/L
 M_N Peso molecular del nitrógeno en g/mol (14g/mol)
 m_p Masa de suelo secado al aire utilizada para la prueba, en g
 W_{H_2O} Contenido ponderado de agua, expresado en porcentaje en masa (0.8919)

- *Contenido de carbón orgánico del suelo de la mina Carreau Wendel:*

Resultados obtenidos para el método ANNE

| Muestra | | Masa de la muestra (g) | V_{eq} (mL) | Masa de C (g) | % C |
|---------------------|----------------|------------------------|---------------|---------------|-------|
| Blanco | | - | 3,35 | - | - |
| Glucosa | | 1 mL | 1,8 | 0.0093 | |
| Suelo de la mina | F ₁ | 0,1012 | 1,3 | 0,013 | 12,45 |
| | F ₂ | 0,1119 | 1,35 | 0,012 | 10,99 |
| | F ₃ | 0,1006 | 0,9 | 0,015 | 14,97 |
| Promedio | | 0,10 | 1,18 | 0,01 | 12,8 |
| Desviación Estándar | | 0,01 | 0,25 | 0,00 | 2,01 |
| Suelo Standard | S ₁ | 0,5011 | 1,6 | 0,011 | 2,15 |
| | S ₂ | 0,5290 | 1,4 | 0,012 | 2,26 |
| Promedio | | 0,52 | 1,5 | 0,01 | 2,21 |
| Desviación Estándar | | 0,02 | 0,14 | 0,00 | 0,08 |

Formula,

$$\% C = \frac{((Y - X) * 0,615 * 100 * a)}{m_p * a'}$$

Donde,

- X Volumen equivalente de Sal de Mohr para la titulación de la muestra
Y Volumen equivalente de Sal de Mohr para la titulación del Blanco
m_p Masa de suelo utilizada para la prueba, en mg
a Volumen total del licor una vez diluido (100ml)
a' Volumen de la alícuota utilizada para la titulación (10ml)

Resultados obtenidos para la Pérdida al Fuego:

| Muestra | | m ₀ (g) (105°C) | m ₁ (g) (900°C) | PAF (g) | % C |
|------------------------|----------------|-------------------------------|-------------------------------|---------|-------|
| Suelo de la mina | F ₁ | 24,99 | 24,82 | 0,17 | 17,59 |
| | F ₂ | 25,16 | 24,98 | 0,17 | 17,59 |
| | F ₃ | 23,87 | 23,69 | 0,18 | 18,37 |
| Promedio | | 24,67 | 24,50 | 0,18 | 17,85 |
| Desviación Estándar | | 0,70 | 0,70 | 0,01 | 0,45 |
| Suelo Standard | S ₁ | 69,81 | 69,61 | 0,20 | 19,90 |
| | S ₂ | 61,37 | 61,17 | 0,20 | 20,08 |
| | S ₃ | 63,87 | 63,67 | 0,20 | 19,91 |
| Promedio | | 65,02 | 64,82 | 0,20 | 19,96 |
| Desviación Estándar | | 4,34 | 4,34 | 0,00 | 0,10 |

Formula,

$$PAF = \frac{m_0 - m_1}{m_0} * 100$$

Donde,

- m₀ Masa de suelo, en gramos, secado a 105°C
m₁ Masa de suelo, en gramos, después de calcinación a 900°C

- *Composición granulométrica del suelo de la mina Carreau Wendel:*

Resultados obtenidos para el análisis de las arenas:

| Muestra | | Masa de la prueba (g) | m _s | m' _s | M _s | %S | M _{SG} | %SG | M _{SF} | %SF |
|---------------------|----------------|-----------------------|----------------|-----------------|----------------|-------|-----------------|-------|-----------------|-------|
| Suelo de la mina | F ₁ | 20,01 | 29,03 | 43,80 | 14,77 | 73,83 | 12,61 | 63,01 | 2,09 | 10,43 |
| | F ₂ | 20,00 | 30,19 | 45,22 | 15,03 | 75,15 | 13,00 | 64,97 | 1,98 | 9,90 |
| | F ₃ | 20,02 | 41,78 | 56,97 | 15,18 | 75,84 | 12,26 | 61,24 | 2,85 | 14,21 |
| Promedio | | 20,01 | 33,67 | 48,66 | 15,00 | 74,94 | 12,62 | 63,07 | 2,30 | 11,52 |
| Desviación Estándar | | 0,01 | 7,05 | 7,23 | 0,21 | 1,02 | 0,37 | 1,86 | 0,47 | 2,35 |
| Suelo Standard | | 20,00 | 34,56 | 42,77 | 8,21 | 41,05 | 1,72 | 8,61 | 6,40 | 32,02 |

Formulas,

$$M_x = m_x - m'_x$$

Donde,

m Masa (g) del recipiente

m' Masa (g) del recipiente con la muestra de suelo secada a 105°C

M Masa (g) final de suelo recuperado

$$S \% = M_s * \frac{100}{m_p}$$

Donde,

m_p Masa de suelo utilizada para la prueba, en g

Resultados obtenidos para los limos y las arcillas:

| Muestra | | m _P (g) | m ₁ (g) | m' ₁ (g) | M ₁ (g) | m ₂ (g) | m' ₂ (g) | M ₂ (g) | m ₃ (g) | m' ₃ (g) | M ₃ (g) | L % | LG% | LF% | A% |
|---------------------|----------------|--------------------|--------------------|---------------------|--------------------|--------------------|---------------------|--------------------|--------------------|---------------------|--------------------|-------|-------|-------|-------|
| Suelo de la mina | F ₁ | 20,01 | 30,37 | 30,49 | 0,12 | 30,32 | 30,43 | 0,11 | 30,31 | 30,39 | 0,07 | 9,68 | 2,24 | 7,44 | 6,38 |
| | F ₂ | 20,00 | 30,46 | 30,60 | 0,14 | 30,85 | 30,97 | 0,12 | 30,70 | 30,78 | 0,08 | 10,96 | 3,70 | 7,26 | 8,18 |
| | F ₃ | 20,02 | 30,69 | 30,82 | 0,13 | 30,58 | 30,69 | 0,11 | 34,90 | 34,98 | 0,07 | 11,55 | 3,46 | 8,09 | 6,07 |
| Promedio | | 20,01 | 30,51 | 30,64 | 0,13 | 30,58 | 30,69 | 0,11 | 31,97 | 32,05 | 0,07 | 10,73 | 3,13 | 7,60 | 6,88 |
| Desviación Estándar | | 0,01 | 0,17 | 0,17 | 0,01 | 0,26 | 0,27 | 0,00 | 2,55 | 2,54 | 0,01 | 1,22 | 0,78 | 0,44 | 1,14 |
| Suelo Standard | | 20,00 | 35,08 | 35,37 | 0,29 | 35,21 | 35,44 | 0,23 | 30,74 | 30,88 | 0,14 | 31,18 | 12,62 | 18,56 | 19,50 |

Formulas,

$$M_x = m_x - m'_x$$

Donde,

| | |
|----|--|
| m | Masa (g) del recipiente |
| m' | Masa (g) del recipiente con la muestra de suelo secada a 105°C |
| M | Masa (g) final de suelo recuperado |
| 1 | 1 ^{era} Toma (a 1' 28", a 20cm profundidad) |
| 2 | 2 ^{da} Toma (a 9' 08", a 20cm profundidad) |
| 3 | 3 ^{era} Toma (a 6h, a 7,9cm de profundidad) |

Limo grueso:

$$LG \% = (M_1 - M_2) * \frac{1000}{25} * \frac{100}{m_p}$$

Limo fino:

$$LF \% = (M_2 - M_3) * \frac{1000}{25} * \frac{100}{m_p}$$

Arcilla:

$$A \% = (M_3 - S) * \frac{1000}{25} * \frac{100}{m_p}$$

Donde,

| | |
|----------------|--|
| m _p | Masa de suelo utilizada para la prueba, en g |
| S | Masa del dispersante en 25ml (0.04 g) |

- *Contenido de elementos en traza metálicos del suelo de la mina Carreau Wendel:*

| | | Masa de la muestra (g) | Cobalto (Co) | | Cromo (Cr) | | Cobre (Cu) | | Níquel (Ni) | | Plomo (Pb) | | Zinc (Zn) | |
|----------------------------|-----------------|------------------------|--------------|------------|------------|----------|------------|-------------|-------------|------------|------------|----------|-----------|------------|
| Muestra | | | mg/L | mg/kg | mg/L | mg/kg | mg/L | mg/kg | mg/L | mg/kg | mg/L | mg/kg | mg/L | mg/kg |
| Blanco | | — | -0,01 | — | 0,10 | — | 0,01 | — | 0,06 | — | 0,40 | — | 0,60 | — |
| Suelo de mina | F ₁ | 3,0021 | 0,42 | 14,5636 | 0,52 | 14,2249 | 1,43 | 48,0938 | 1,60 | 52,1580 | 3,29 | 97,8810 | 0,61 | 1,6934 |
| | F ₂ | 3,0028 | 0,45 | 15,5760 | 0,60 | 16,9305 | 1,41 | 47,4053 | 1,63 | 53,1617 | 3,20 | 94,8107 | 0,78 | 30,4749 |
| Promedio | | 3,0025 | 0,4350 | 15,0698 | 0,5600 | 15,5777 | 1,4200 | 47,7496 | 1,6150 | 52,6599 | 3,2450 | 96,3458 | 0,6950 | 16,0842 |
| Desviación estándar | | 0,0005 | 0,0212 | 0,7159 | 0,0566 | 1,9131 | 0,0141 | 0,4868 | 0,0212 | 0,7097 | 0,0636 | 2,1710 | 0,1202 | 20,3515 |
| Suelo Standard | S ₁ | 3,0002 | 0,17 | 6,1003 | 0,57 | 15,9284 | 0,38 | 12,5394 | 0,76 | 23,7232 | 1,61 | 41,0073 | 0,62 | 3,3890 |
| | S ₂ | 3,0017 | 0,16 | 5,7585 | 0,52 | 14,2268 | 0,37 | 12,1944 | 0,76 | 23,7114 | 1,67 | 43,0192 | 0,69 | 15,2430 |
| Promedio | | 3,0010 | 0,1650 | 5,9294 | 0,5450 | 15,0776 | 0,3750 | 12,3669 | 0,7600 | 23,7173 | 1,6400 | 42,0132 | 0,6550 | 9,3160 |
| Desviación estándar | | 0,0011 | 0,0071 | 0,2417 | 0,0354 | 1,2032 | 0,0071 | 0,2440 | 0,0000 | 0,0084 | 0,0424 | 1,4226 | 0,0495 | 8,3820 |
| Suelo Standard Contaminado | SP ₁ | 3,0181 | 0,33 | 11,4544 | 1,20 | 37,0582 | 1,81 | 60,6407 | 1,51 | 48,8495 | 5,31 | 165,4145 | 2,81 | 372,2668 |
| | SP ₂ | 3,0110 | 0,34 | 11,8191 | 1,29 | 40,1848 | 1,80 | 60,4460 | 1,53 | 49,6401 | 5,23 | 163,1030 | 2,85 | 379,8983 |
| Promedio | | 3,0146 | 0,3350 | 11,6367 | 1,2450 | 38,6215 | 1,8050 | 60,5434 | 1,5200 | 49,2448 | 5,2700 | 164,2587 | 2,8300 | 376,0826 |
| Desviación estándar | | 0,0050 | 0,0071 | 0,2579 | 0,0636 | 2,2108 | 0,0071 | 0,1377 | 0,0141 | 0,5590 | 0,0566 | 1,6344 | 0,0283 | 5,3963 |
| Especificaciones | | — | — | 15,3 ± 1,5 | — | 119 ± 30 | — | 81,6 ± 19,9 | — | 52,0 ± 6,1 | — | 240 ± 63 | — | 1396 ± 107 |

| | | |
|---------------|------|---|
| Dilution | 1 | 5 |
| %Wdm(<200 µm) | 0,98 | |

Donde,

mg/L Concentración registrada en el espectrofotómetro de absorción atómica ([ETM])
mg/kg Contenido en el suelo

Formula,

$$\text{Contenido de ETM en el suelo} = \frac{([ETM] - [\text{Blanco}]) * 100 * d}{m_p * W_{dm}}$$

Donde,

D Número de diluciones realizadas para el análisis
m_p Masa de suelo utilizada para la prueba, en g
W_{dm} Contenido de materia seca

- *Capacidad de intercambio catiónico del suelo de la mina Carreau Wendel*

Determinación de las bases intercambiables en el acetato de amonio percolado

| Muestra | | Masa de la muestra (g) | K ₂ O | | | MgO | | | CaO | | | Σ |
|---------------------|----------------|------------------------|----------------------|------------------------------|-----------|----------------------|------------------------------|-----------|----------------------|------------------------------|-----------|-------|
| | | | Concentración (mg/L) | Contenido en el suelo (g/kg) | cmoles/kg | Concentración (mg/L) | Contenido en el suelo (g/kg) | cmoles/kg | Concentración (mg/L) | Contenido en el suelo (g/kg) | cmoles/kg | |
| Blanco | | | 0,30 | | | | | | -0,30 | | | |
| Suelo de mina | F ₁ | 2,5106 | 5,90 | 136,60 | 0,29 | 13,56 | 319,05 | 1,60 | 41,80 | 1019,60 | 3,64 | 5,53 |
| | F ₂ | 2,5006 | 6,30 | 146,94 | 0,69 | 14,89 | 352,90 | 1,76 | 45,40 | 1111,84 | 3,97 | 6,42 |
| Promedio | | 2,5066 | 6,10 | 141,77 | 0,49 | 14,23 | 335,98 | 1,68 | 43,60 | 1065,72 | 3,81 | 5,98 |
| Desviación estándar | | 0,0071 | 0,28 | 7,31 | 0,28 | 0,94 | 23,94 | 0,11 | 2,55 | 65,22 | 0,23 | 0,63 |
| Suelo Standard | S ₁ | 2,5019 | 6,40 | 149,39 | 0,70 | 12,75 | 300,49 | 1,50 | 178,10 | 4361,63 | 15,58 | 17,78 |
| | S ₂ | 2,5140 | 6,40 | 148,79 | 0,70 | 11,81 | 276,36 | 1,38 | 162,80 | 3971,05 | 14,18 | 16,26 |
| Promedio | | 2,5080 | 6,40 | 149,09 | 0,70 | 12,28 | 288,43 | 1,44 | 170,45 | 4166,34 | 14,88 | 17,02 |
| Desviación estándar | | 0,0066 | 0,00 | 0,42 | 0,00 | 0,66 | 17,06 | 0,08 | 10,82 | 276,18 | 0,99 | 1,07 |

Donde,

Σ Sumatoria de las bases intercambiables presentes en la solución

Formulas,

$$\text{Contenido de óxido en el suelo} = \frac{([\text{óxido}] - [\text{Blanco}]) * 60}{m_p * W_{dm}}$$

Donde,

m_p Masa de suelo utilizada para la muestra, en g
W_{dm} Contenido de material seco

$$\text{cmoles positivas por kg de suelo} = \frac{\text{Contenido de óxido en el suelo}}{(M_{\text{óxido}} / 200) * 10^3}$$

Donde,

M_{óxido} Peso molecular del óxido

Determinación de la CEC por titulación con nitrógeno amoniacal

| Muestra | | Masa de la muestra (g) | V _{eq} (mL) | CEC (cmoles/kg) |
|---------------------|----------------|------------------------|----------------------|-----------------|
| Blanco | | — | 0,2 | — |
| Suelo de mina | F ₁ | 2,5019 | 4,15 | 9,86 |
| | F ₂ | 2,5140 | 4,80 | 11,43 |
| Promedio | | 2,5080 | 4,48 | 10,65 |
| Desviación estándar | | 0,0086 | 0,46 | 1,11 |
| Suelo Standard | S ₁ | 2,5106 | 4,95 | 11,82 |
| | S ₂ | 2,5006 | 5,30 | 12,74 |
| Promedio | | 2,5056 | 5,13 | 12,28 |
| Desviación estándar | | 0,0071 | 0,25 | 0,65 |

Donde,

V_{eq} Volumen de ácido sulfúrico utilizado para la titulación

Formula,

$$CEC = \frac{(V_1 - V_0) * 2c * 50 * 100}{v * m_p}$$

Donde,

- V₁ Volumen en mL de la solución de ácido sulfúrico utilizado para la muestra
- V₀ Volumen en mL de la solución de ácido sulfúrico utilizado para el blanco
- c Concentración en mol/L de la solución de ácido sulfúrico
- v Volumen en mL del destilado utilizado para la titulación (40mL)
- m_p Masa de suelo utilizada para la muestra, en g

Anexo E. Registros de la evolución del crecimiento de *Miscanthus x giganteus* – Suelo Standard

- Seguimiento a la altura de MxG sin tratamiento:

| Fecha | Modalidad | | | | | | | | | | |
|----------|-----------|-------|---------|-------|-------|-------|-------|---------|-------|-------|---------|
| | 10000 | | | 10010 | | | | | 10001 | | |
| | Ind 1 | Ind 2 | Ind 3 * | Ind 1 | Ind 2 | Ind 3 | Ind 4 | Ind 5 * | Ind 1 | Ind 2 | Ind 3 * |
| 30-juin | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 3-juil. | 1,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1,0 | 0,0 | 0,0 |
| 5-juil. | 1,0 | 0,0 | 0,0 | 2,5 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1,0 | 1,0 | 0,0 |
| 10-juil. | 1,0 | 4,5 | 0,0 | 11,3 | 8,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1,0 | 8,5 | 0,0 |
| 12-juil. | 4,0 | 11,5 | 0,0 | 16,0 | 15,5 | 1,0 | 0,0 | 0,0 | 1,5 | 17,5 | 0,0 |
| 13-juil. | 6,0 | 17,0 | 0,0 | 18,0 | 21,5 | 3,5 | 0,0 | 0,0 | 1,5 | 20,0 | 0,0 |
| 17-juil. | 22,0 | 32,0 | 0,0 | 24,0 | 34,5 | 11,0 | 0,0 | 0,0 | 1,5 | 32,5 | 1,0 |
| 19-juil. | 28,0 | 36,0 | 0,0 | 29,5 | 39,0 | 17,0 | 1,0 | 0,0 | 1,5 | 38,0 | 1,0 |
| 21-juil. | 37,0 | 41,0 | 2,0 | 34,0 | 45,0 | 23,0 | 6,0 | 0,0 | 1,5 | 41,0 | 1,5 |
| 24-juil. | 46,5 | 53,7 | 5,0 | 37,2 | 54,5 | 24,0 | 19,0 | 0,0 | 2,7 | 55,0 | 12,0 |
| 27-juil. | 54,5 | 53,7 | 5,5 | 40,0 | 60,0 | 43,0 | 26,0 | 0,0 | 4,0 | 58,0 | 20,0 |
| 4-août | 78,0 | 66,0 | 8,5 | 64,5 | 70,0 | 57,0 | 46,0 | 1,5 | 11,5 | 69,5 | 49,5 |
| 11-août | 88,0 | 69,5 | 8,5 | 72,0 | 78,0 | 65,5 | 59,0 | 3,5 | 17,0 | 75,0 | 64,0 |
| 17-août | 90,0 | 73,0 | 8,5 | 79,0 | 84,0 | 69,0 | 74,0 | 4,0 | 21,0 | 82,0 | 78,0 |
| 25-août | 106,0 | 75,0 | 9,0 | 85,5 | 87,5 | 78,0 | 94,5 | 4,0 | 26,5 | 90,0 | 94,5 |
| 1-sept. | 110,0 | 76,0 | 10,5 | 87,0 | 90,0 | 80,5 | 99,5 | 5,0 | 33,5 | 92,5 | 103,0 |
| 8-sept. | 115,5 | 80,5 | 12,5 | 88,5 | 93,5 | 86,0 | 107,5 | 6,0 | 41,5 | 96,0 | 108,5 |
| 15-sept. | 121,0 | 81,5 | 27,0 | 89,5 | 96,5 | 89,5 | 114,5 | 6,3 | 51,0 | 98,0 | 116,7 |
| 22-sept. | 121,0 | 81,5 | 42,0 | 90,5 | 98,5 | 93,5 | 121,5 | 0,0 | 63,0 | 98,5 | 122,2 |
| 25-sept. | 122,0 | 81,5 | 47,0 | 90,5 | 98,5 | 95,0 | 124,0 | 0,0 | 69,0 | 99,9 | 126,0 |

Altura promedio de MxG sin tratamiento:

| | Modalidad 10000 | Modalidad 10010 | Modalidad 10001 | TRATAMIENTO |
|-----------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------|
| Promedio | 101,8 | 102,0 | 84,5 | 96,1 |
| Promedio* | 83,5 | 81,6 | 98,3 | 87,8 |

10000: MxG sola; 10010: MxG y Bct; 10001: MxG y Cost

* Individuos cuyo brote fue reemplazado pasados 15 días de iniciado el experimento

- Seguimiento a la altura de MxG con tratamiento HAP:

| Fecha | Modalidad | | | | | | | | | |
|----------|-----------|-------|-------|-------|---------|-------|-------|-------|-------|---------|
| | 11000 | | | 11010 | | 11001 | | | | |
| | Ind 1 | Ind 2 | Ind 3 | Ind 1 | Ind 2 * | Ind 1 | Ind 2 | Ind 3 | Ind 4 | Ind 5 * |
| 30-juin | 1,0 | 1,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 3-juil. | 4,0 | 1,0 | 1,0 | < 1 | 0,0 | 1,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 5-juil. | 12,0 | 2,5 | 3,5 | 7,0 | 0,0 | 3,5 | 1,5 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 10-juil. | 23,0 | 14,5 | 6,5 | 17,0 | 0,0 | 14,7 | 10,5 | 2,0 | 0,0 | 0,0 |
| 12-juil. | 35,0 | 25,5 | 7,0 | 19,0 | 0,0 | 24,0 | 18,0 | 12,0 | 0,0 | 0,0 |
| 13-juil. | 40,0 | 31,0 | 7,0 | 25,0 | 0,0 | 27,0 | 21,0 | 16,5 | 0,0 | 0,0 |
| 17-juil. | 60,0 | 46,0 | 7,5 | 34,0 | 1,0 | 31,0 | 35,0 | 31,0 | 1,5 | 0,0 |
| 19-juil. | 65,0 | 51,0 | 7,5 | 33,5 | 1,0 | 42,0 | 40,0 | 35,0 | 4,0 | 0,0 |
| 21-juil. | 69,0 | 54,0 | 8,0 | 35,0 | 1,0 | 48,0 | 44,0 | 42,0 | 9,5 | 1,0 |
| 24-juil. | 83,5 | 65,5 | 8,0 | 37,0 | 3,6 | 59,0 | 58,5 | 54,5 | 18,0 | 1,0 |
| 27-juil. | 85,0 | 67,0 | 8,0 | 38,0 | 8,0 | 57,0 | 59,0 | 59,0 | 26,0 | 1,0 |
| 4-août | 91,0 | 76,5 | 2,5 | 46,5 | 43,5 | 61,0 | 62,5 | 68,0 | 49,5 | 0,0 |
| 11-août | 93,0 | 80,0 | 4,0 | 57,5 | 65,5 | 60,0 | 66,0 | 76,0 | 63,5 | 0,0 |
| 17-août | 93,0 | 83,0 | 5,0 | 65,5 | 75,0 | 66,0 | 72,0 | 78,0 | 68,0 | 0,0 |
| 25-août | 93,0 | 88,0 | 10,7 | 78,0 | 88,0 | 69,0 | 81,0 | 86,0 | 87,0 | 0,0 |
| 1-sept. | 93,0 | 93,0 | 16,0 | 84,5 | 102,5 | 70,5 | 83,0 | 88,0 | 94,0 | 0,0 |
| 8-sept. | 93,0 | 93,0 | 30,5 | 92,5 | 107,3 | 71,0 | 86,0 | 91,0 | 100,0 | 0,0 |
| 15-sept. | 93,5 | 93,5 | 47,5 | 97,2 | 111,5 | 71,0 | 88,0 | 92,5 | 108,0 | 0,0 |
| 22-sept. | 93,5 | 93,5 | 61,0 | 100,0 | 114,6 | 70,5 | 88,7 | 93,5 | 112,5 | 0,0 |
| 25-sept. | 94,0 | 94,5 | 71,7 | 101,5 | 116,5 | 70,0 | 89,0 | 94,5 | 113,0 | 0,0 |

Altura promedio de MxG con tratamiento HAP:

| | Modalidad 11000 | Modalidad 11010 | Modalidad 11001 | TRATAMIENTO |
|-----------|-----------------|-----------------|-----------------|-------------|
| Promedio | 86,7 | 101,5 | 91,6 | 93,3 |
| Promedio* | | 109,0 | 73,3 | 89,7 |

11000: MxG y HAP; 11010: MxG, HAP y Bct; 11001: MxG, HAP y Cost

* Individuos cuyo brote fue remplazado pasados 15 días de iniciado el experimento

- Seguimiento a la altura de MxG con tratamiento HAP-ETM:

| Fecha | Modalidad | | | | | | | | | | |
|----------|-----------|-------|-------|-------|-------|---------|---------|---------|-------|-------|---------|
| | 11100 | | | 11110 | | | | | 11101 | | |
| | Ind 1 | Ind 2 | Ind 3 | Ind 1 | Ind 2 | Ind 3 * | Ind 4 * | Ind 5 * | Ind 1 | Ind 2 | Ind 3 * |
| 30-juin | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 3-juil. | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1,0 | 0,0 | 0,0 |
| 5-juil. | 2,0 | 1,3 | 0,0 | 3,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1,3 | 1,0 | 0,0 |
| 10-juil. | 11,5 | 6,5 | 0,0 | 8,3 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 7,3 | 1,0 | 0,0 |
| 12-juil. | 20,5 | 9,0 | 0,0 | 10,5 | 2,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 11,5 | 1,0 | 0,0 |
| 13-juil. | 25,0 | 11,0 | 0,0 | 11,0 | 4,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 13,5 | 1,0 | 0,0 |
| 17-juil. | 40,0 | 13,0 | 0,0 | 14,0 | 15,0 | 6,0 | 9,0 | 0,0 | 21,0 | 8,5 | 2,5 |
| 19-juil. | 45,0 | 13,0 | 1,0 | 17,0 | 21,0 | 10,0 | 14,0 | 1,0 | 23,0 | 12,0 | 2,5 |
| 21-juil. | 49,0 | 16,0 | 0,0 | 22,0 | 25,0 | 14,5 | 20,0 | 1,5 | 26,0 | 13,0 | 2,5 |
| 24-juil. | 58,5 | 19,7 | 0,0 | 33,5 | 37,4 | 17,0 | 30,0 | 5,0 | 29,0 | 21,5 | 3,5 |
| 27-juil. | 64,0 | 23,5 | 0,0 | 39,0 | 40,0 | 19,0 | 37,5 | 6,0 | 31,0 | 24,5 | 4,0 |
| 4-août | 73,0 | 33,5 | 0,0 | 62,0 | 55,0 | 26,0 | 62,5 | 9,5 | 44,5 | 30,0 | 4,0 |
| 11-août | 73,0 | 44,0 | 0,0 | 65,5 | 61,0 | 32,5 | 62,5 | 11,5 | 53,0 | 36,5 | 0,0 |
| 17-août | 76,0 | 50,0 | 0,0 | 74,0 | 65,0 | 35,0 | 69,0 | 12,5 | 57,0 | 40,5 | 0,0 |
| 25-août | 78,0 | 58,0 | 0,0 | 79,5 | 71,0 | 52,0 | 74,0 | 23,0 | 65,0 | 47,0 | 0,0 |
| 1-sept. | 81,0 | 62,5 | 0,0 | 85,0 | 79,5 | 61,0 | 79,0 | 34,0 | 72,0 | 53,5 | 0,0 |
| 8-sept. | 82,5 | 71,0 | 0,0 | 88,0 | 83,5 | 79,0 | 87,0 | 54,5 | 75,5 | 58,5 | 0,0 |
| 15-sept. | 88,0 | 73,0 | 0,0 | 91,0 | 89,0 | 87,5 | 90,5 | 77,5 | 82,0 | 62,5 | 0,0 |
| 22-sept. | 90,5 | 75,0 | 0,0 | 93,6 | 95,5 | 95,0 | 94,5 | 77,5 | 86,0 | 63,5 | 0,0 |
| 25-sept. | 92,0 | 75,0 | 0,0 | 94,5 | 98,8 | 98,5 | 105,0 | 77,5 | 89,0 | 65,0 | 0,0 |

Altura promedio de MxG con tratamiento HAP-ETM:

| | Modalidad 11100 | Modalidad 11110 | Modalidad 11101 | TRATAMIENTO |
|-----------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------|
| Promedio | 55,7 | 96,7 | 77,0 | 76,4 |
| Promedio* | | 94,9 | 51,3 | 73,1 |

11100: MxG, HAP y ETM; 11110: MxG, HAP, ETM y Bct; 11101: MxG, HAP, ETM y Cost

* Individuos cuyo brote fue remplazado pasados 15 días de iniciado el experimento

- Seguimiento a la altura de MxG con tratamiento ETM:

| | Modalidad | | | | | | | | | | | | | | | |
|----------|-----------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|
| Fecha | 10100 | | | | | 10110 | | | | | | 10101 | | | | |
| | Ind 1 | Ind 2 | Ind 3 | Ind 4* | Ind 5 | Ind 1 | Ind 2 | Ind 3 | Ind 4 | Ind 5 | Ind 6 | Ind 1 | Ind 2 | Ind 3 | Ind 4* | Ind 5* |
| 30-juin | 1,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 3-juil. | 2,5 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1,0 | 4,0 | 1,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 5-juil. | 6,8 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 5,0 | 11,3 | 1,8 | 1,0 | 0,0 | 0,0 | 1,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 10-juil. | 15,5 | 9,5 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 16,5 | 17,0 | 9,0 | 1,0 | 0,0 | 0,0 | 1,0 | 2,5 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 12-juil. | 22,0 | 17,5 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 20,0 | 21,5 | 10,5 | 1,0 | 3,5 | 1,0 | 1,0 | 11,5 | 2,5 | 0,0 | 0,0 |
| 13-juil. | 26,5 | 23,5 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 24,0 | 21,5 | 10,0 | 1,0 | 7,5 | 4,0 | 1,0 | 17,0 | 6,0 | 0,0 | 0,0 |
| 17-juil. | 33,0 | 35,0 | 2,0 | 0,0 | 0,0 | 36,0 | 23,0 | 11,0 | 1,0 | 18,0 | 24,0 | 1,0 | 34,5 | 20,0 | 1,0 | 0,0 |
| 19-juil. | 37,0 | 41,0 | 5,0 | 1,0 | 0,0 | 39,0 | 23,0 | 11,0 | 1,0 | 25,0 | 31,0 | 1,0 | 38,0 | 31,0 | 1,0 | 0,0 |
| 21-juil. | 42,0 | 49,0 | 12,0 | 1,5 | 0,0 | 40,0 | 27,0 | 11,0 | 0,0 | 31,0 | 40,0 | 1,0 | 43,5 | 35,0 | 1,5 | 1,0 |
| 24-juil. | 54,5 | 56,5 | 28,5 | 7,7 | 0,0 | 45,0 | 36,5 | 11,5 | 0,0 | 40,0 | 52,0 | 1,0 | 56,5 | 45,0 | 4,5 | 4,4 |
| 27-juil. | 64,0 | 62,0 | 34,0 | 11,5 | 1,0 | 48,0 | 39,0 | 11,5 | 0,0 | 46,0 | 64,0 | 1,0 | 64,0 | 52,0 | 6,0 | 8,0 |
| 4-août | 72,0 | 78,0 | 66,5 | 35,5 | 0,0 | 52,5 | 63,2 | 11,5 | 25,8 | 61,5 | 82,5 | 0,0 | 79,0 | 68,5 | 13,8 | 31,0 |
| 11-août | 75,0 | 80,0 | 66,5 | 48,5 | 0,0 | 56,0 | 73,5 | 4,5 | 43,5 | 72,0 | 82,5 | 0,0 | 80,0 | 73,0 | 14,5 | 45,0 |
| 17-août | 81,0 | 82,0 | 86,0 | 58,0 | 0,0 | 56,0 | 83,0 | 9,5 | 59,0 | 76,0 | 82,5 | 0,0 | 84,0 | 75,0 | 14,5 | 50,0 |
| 25-août | 88,5 | 88,0 | 96,0 | 73,5 | 0,0 | 64,0 | 96,0 | 18,5 | 76,0 | 80,0 | 96,0 | 0,0 | 89,0 | 83,0 | 15,0 | 65,0 |
| 1-sept. | 92,5 | 92,0 | 98,0 | 78,5 | 0,0 | 67,0 | 105,0 | 23,5 | 82,5 | 82,0 | 97,5 | 0,0 | 92,5 | 84,5 | 15,5 | 75,5 |
| 8-sept. | 96,0 | 94,7 | 100,0 | 87,5 | 0,0 | 75,5 | 107,5 | 36,0 | 92,2 | 84,5 | 102,5 | 0,0 | 95,0 | 90,0 | 0,0 | 81,0 |
| 15-sept. | 99,5 | 97,0 | 104,5 | 94,5 | 0,0 | 80,5 | 110,0 | 50,5 | 100,0 | 85,5 | 107,0 | 0,0 | 96,5 | 93,0 | 0,0 | 90,0 |
| 22-sept. | 101,0 | 105,0 | 107,0 | 98,5 | 0,0 | 82,5 | 111,0 | 67,3 | 106,0 | 87,0 | 112,0 | 0,0 | 96,5 | 95,0 | 0,0 | 93,0 |
| 25-sept. | 101,0 | 102,0 | 107,0 | 100,0 | 0,0 | 87,6 | 111,0 | 72,6 | 110,0 | 87,6 | 112,0 | 0,0 | 97,2 | 96,5 | 0,0 | 96,0 |

Altura promedio de MxG con tratamiento ETM:

| | Modalidad 10100 | Modalidad 10110 | Modalidad 10101 | TRATAMIENTO |
|-----------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------|
| Promedio | 77,5 | 96,8 | 64,6 | 79,6 |
| Promedio* | 82,0 | | 57,9 | 70,0 |

10100: MxG y ETM; 10110: MxG, ETM y Bct; 10101: MxG, ETM y Cost

* Individuos cuyo brote fue remplazado pasados 15 días de iniciado el experimento

Anexo F. Biomasa de *Miscanthus x giganteus* – suelo Standard

- *Biomasa de MxG sin tratamiento:*

| MxG sin tratamiento | | # de tallos 2 ^{rios} | BIOMASA de MxG (107 °C) | | | | | |
|---------------------|------------|----------------------------------|---------------------------------------|------|--|------|----------------------------------|-------------|
| | | | Parte Aérea (M _{PA} en g) | | Parte Subterránea Raíces (M _R en g) | | Rizoma (M _{RZ} en g) | TOTAL (g) |
| Modalidad 10000 | Ind 1 | 2 | T | 3,02 | R _p | 1,18 | 4,02 | 12,07 |
| | | | H | 2,56 | R _s | 1,30 | | |
| | | | Σ | 5,58 | Σ | 2,47 | | |
| | Ind 2 | 3 | 3,26 | | 2,06 | | 1,89 | 7,21 |
| | Ind 3 * | 0 | 0,28 | | 0,06 | | 0,61 | 0,95 |
| | Promedio | 2,5 ; 1,7 | 4,42 ; 3,04 | | 2,27 ; 1,53 | | 3,00 ; 2,17 | 9,69 ; 6,74 |
| | Desviación | 0,7 ; 1,5 | 1,64 ; 2,66 | | 0,29 ; 1,29 | | 1,50 ; 1,72 | 3,44 ; 3,43 |
| Modalidad 10010 | Ind 1 | 4 | 4,55 | | 2,55 | | 2,76 | 9,86 |
| | Ind 2 | 1 | 4,73 | | 2,60 | | 2,88 | 10,21 |
| | Ind 3 | 2 | 3,63 | | 2,03 | | 1,76 | 7,42 |
| | Ind 4 | 1 | 4,17 | | 2,07 | | 2,70 | 8,94 |
| | Promedio | 2,0 | 4,27 | | 2,31 | | 2,53 | 9,11 |
| | Desviación | 1,4 | 0,49 | | 0,30 | | 0,52 | 1,25 |
| Modalidad 10001 | Ind 1 | 2 | 1,76 | | 0,46 | | 1,56 | 3,78 |
| | Ind 2 | 3 | 4,94 | | 2,60 | | 2,92 | 10,46 |
| | Ind 3 * | 0 | 4,79 | | 2,07 | | 2,08 | 8,94 |
| | Promedio | 2,5 ; 1,7 | 3,35 ; 3,83 | | 1,53 ; 1,71 | | 2,24 ; 2,19 | 7,12 ; 7,73 |
| | Desviación | 0,7 ; 1,5 | 2,25 ; 1,80 | | 1,51 ; 1,11 | | 0,96 ; 0,69 | 4,72 ; 3,50 |
| PROMEDIO TOTAL | | 2,33 ; 1,8 | 4,08 ; 3,71 | | 2,04 ; 1,85 | | 2,59 ; 2,30 | 8,64 ; 7,86 |
| DESVIACIÓN TOTAL | | 0,29 ; 0,20 | 0,58 ; 0,62 | | 0,44 ; 0,41 | | 0,44 ; 0,30 | 1,35 ; 1,19 |

Donde,

| | | | | | |
|----|-------------|----------------|--------------------|----|------------------|
| PA | Parte aérea | R | Raíces | Rz | Rizoma |
| T | Tallos | R _p | Raíces primarias | * | Brote remplazado |
| H | Hojas | R _s | Raíces secundarias | | |

Relación parte aérea – raíz promedio de MxG sin tratamiento:

| | Modalidad 10000 | Modalidad 10010 | Modalidad 10001 | TRATAMIENTO |
|----------|-----------------|-----------------|-----------------|-------------|
| PA / R | 1,95 | 1,85 | 2,19 | 2,00 |
| PA / R * | 1,99 | — | 2,24 | 2,11 |

- *Biomasa de MxG con tratamiento HAP:*

| MxG con tratamiento HAP | | # de tallos 2 ^{rios} | BIOMASA de MxG (107 °C) | | | |
|----------------------------|------------|----------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|-------------|
| | | | Parte Aérea (M _{PA} en g) | Parte Subterránea | | TOTAL (g) |
| | | | | Raíces (M _R en g) | Rizoma (M _{RZ} en g) | |
| Modalidad 11000 | Ind 1 | 2 | 4,97 | 2,04 | 4,02 | 11,03 |
| | Ind 2 | 4 | 6,10 | 3,00 | 2,40 | 11,50 |
| | Ind 3 | 0 | 0,62 | 0,12 | 1,02 | 1,76 |
| | Promedio | 2,0 | 3,90 | 1,72 | 2,48 | 8,10 |
| | Desviación | 2,0 | 2,89 | 1,47 | 1,50 | 6,55 |
| Modalidad 11010 | Ind 1 | 3 | 4,67 | 2,35 | 2,04 | 9,06 |
| | Ind 2 * | 2 | 4,21 | 1,79 | 1,80 | 7,80 |
| | Promedio | 3,0 ; 2,5 | 4,67 ; 4,44 | 2,35 ; 2,07 | 2,04 ; 1,92 | 9,06 ; 8,43 |
| | Desviación | 0,0 ; 0,7 | 0,0 ; 0,33 | 0,0 ; 0,40 | 0,0 ; 0,17 | 0 ; 0,89 |
| Modalidad 11001 | Ind 1 | 3 | 4,20 | 2,49 | 2,92 | 9,61 |
| | Ind 2 | 2 | 4,35 | 2,49 | 2,90 | 9,74 |
| | Ind 3 | 3 | 4,26 | 2,57 | 2,00 | 8,83 |
| | Ind 4 | 2 | 4,45 | 1,90 | 1,60 | 7,95 |
| | Promedio | 2,5 | 4,31 | 2,36 | 2,36 | 9,03 |
| | Desviación | 0,6 | 0,11 | 0,31 | 0,66 | 0,83 |
| PROMEDIO TOTAL | | 2,5 ; 2,33 | 4,29 ; 4,22 | 2,14 ; 2,05 | 2,29 ; 2,25 | 8,73 ; 8,52 |
| DESVIACIÓN TOTAL | | 0,5 ; 0,25 | 0,39 ; 0,28 | 0,37 ; 0,32 | 0,23 ; 0,29 | 0,55 ; 0,47 |

Donde,

PA Parte aérea R_p Raíces primarias Rz Rizoma
R Raíces R_s Raíces secundarias * Brote remplazado

Relación parte aérea – raíz promedio de MxG con tratamiento HAP:

| | Modalidad 11000 | Modalidad 11010 | Modalidad 11001 | TRATAMIENTO |
|----------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------|
| PA / R | 2,27 | 1,99 | 1,83 | 2,03 |
| PA / R * | | 2,14 | | 2,08 |

- Biomasa de MxG con tratamiento HAP - ETM:

| MxG con tratamiento HAP - ETM | | # de tallos 2 ^{rios} | BIOMASA de MxG (107°C) | | | | | |
|-------------------------------|------------|----------------------------------|---------------------------------------|------|---------------------------------|----------------------------------|-------------|-------------|
| | | | Parte Aérea (M _{PA} en g) | | Parte Subterránea | | TOTAL (g) | |
| | | | | | Raíces (M _R en g) | Rizoma (M _{RZ} en g) | | |
| Modalidad 11100 | Ind 1 | 2 | T | 2,10 | R _P | 0,87 | 3,36 | 10,73 |
| | | | H | 2,16 | R _S | 1,88 | | |
| | | | Σ | 4,26 | Σ | 2,75 | | |
| | Ind 2 | 2 | 2,53 | | 2,20 | | 1,70 | 6,43 |
| | Promedio | 2,0 | 3,39 | | 2,48 | | 2,53 | 8,40 |
| | Desviación | 0,0 | 1,22 | | 0,39 | | 1,17 | 3,04 |
| Modalidad 11110 | Ind 1 | 2 | T | 1,63 | R _P | 0,66 | 1,42 | 6,74 |
| | | | H | 1,82 | R _S | 1,21 | | |
| | | | Σ | 3,44 | Σ | 1,88 | | |
| | Ind 2 | 1 | 2,50 | | 1,32 | | 2,26 | 6,08 |
| | Ind 3 * | 3 | 3,51 | | 2,05 | | 1,80 | 7,36 |
| | Ind 4 * | 2 | 3,26 | | 1,73 | | 1,98 | 6,97 |
| | Promedio | 1,5 ; 2,0 | 2,97 ; 3,18 | | 1,60 ; 1,74 | | 1,84 ; 1,87 | 6,41 ; 6,79 |
| | Desviación | 0,8 | 0,70 ; 0,46 | | 0,39 ; 0,31 | | 0,35 | 0,54 ; 0,47 |
| Modalidad 11101 | Ind 1 | 2 | T | 1,38 | R _P | 0,53 | 1,59 | 6,16 |
| | | | H | 1,83 | R _S | 1,14 | | |
| | | | Σ | 3,21 | Σ | 1,67 | | |
| | Ind 2 | 2 | 2,07 | | 1,36 | | 2,20 | 5,63 |
| | Promedio | 2,0 | 2,64 | | 1,52 | | 1,90 | 6,06 |
| | Desviación | 0,0 | 0,81 | | 0,22 | | 0,43 | 0,37 |
| PROMEDIO TOTAL | | 1,8 ; 2,0 | 3,00 ; 3,07 | | 1,77 ; 1,82 | | 2,09 ; 2,10 | 6,96 ; 7,08 |
| DESVIACIÓN TOTAL | | 0,3 ; 0,0 | 0,38 ; 0,79 | | 0,37 ; 0,35 | | 0,38 ; 0,38 | 1,26 ; 1,20 |

Donde,

| | | | | | |
|----|-------------|----------------|--------------------|----|------------------|
| PA | Parte aérea | R | Raíces | Rz | Rizoma |
| T | Tallos | R _p | Raíces primarias | * | Brote remplazado |
| H | Hojas | R _s | Raíces secundarias | | |

Relación parte aérea – raíz promedio de MxG con tratamiento HAP-ETM:

| | Modalidad 11100 | Modalidad 11110 | Modalidad 11101 | TRATAMIENTO |
|----------|-----------------|-----------------|-----------------|-------------|
| PA / R | 1,37 | 1,86 | 1,74 | 1,65 |
| PA / R * | | 1,83 | | 1,64 |

- *Biomasa de MxG con tratamiento ETM:*

| MxG con tratamiento ETM | | # de tallos 2 ^{rios} | BIOMASA de MxG (107°C) | | | | | |
|-------------------------|------------|----------------------------------|---------------------------------------|------|---------------------------------|----------------------------------|-------------|-------------|
| | | | Parte Aérea (M _{PA} en g) | | Parte Subterránea | | TOTAL (g) | |
| | | | | | Raíces (M _R en g) | Rizoma (M _{RZ} en g) | | |
| Modalidad 10100 | Ind 1 | 2 | 4,43 | | 2,43 | | 3,22 | 10,08 |
| | Ind 2 | 3 | 5,20 | | 2,20 | | 2,68 | 10,08 |
| | Ind 3 | 2 | 4,66 | | 1,91 | | 1,92 | 8,49 |
| | Ind 4 * | 3 | T | 1,58 | R _p | 0,61 | 1,20 | 6,21 |
| | | | H | 1,94 | R _s | 0,88 | | |
| | | | Σ | 3,52 | Σ | 1,49 | | |
| | Promedio | 2,3 ; 2,5 | 4,74 ; 4,45 | | 2,18 ; 2,01 | | 2,61 ; 2,30 | 9,53 ; 8,76 |
| | Desviación | 0,6 | 0,40 ; 0,70 | | 0,26 ; 0,41 | | 0,65 ; 0,90 | 0,92 ; 2,74 |
| 1Modalidad 10110 | Ind 1 | 2 | 4,73 | | 2,23 | | 3,18 | 10,14 |
| | Ind 2 | 0 | 0,78 | | 0,10 | | 1,46 | 2,34 |
| | Ind 3 | 2 | 3,20 | | 1,37 | | 2,04 | 6,61 |
| | Ind 4 | 3 | T | 1,68 | R _p | 0,76 | 1,68 | 7,55 |
| | | | H | 2,21 | R _s | 1,22 | | |
| | | | Σ | 3,89 | Σ | 1,98 | | |
| | Promedio | 1,8 | 3,15 | | 1,42 | | 2,1 | 6,67 |
| | Desviación | 1,3 | 1,70 | | 0,95 | | 0,8 | 3,24 |
| Modalidad 10101 | Ind 1 | 4 | 4,59 | | 2,52 | | 2,52 | 9,63 |
| | Ind 2 | 3 | 4,45 | | 2,39 | | 3,24 | 10,08 |
| | Ind 3 * | 4 | T | 1,24 | R _p | 0,35 | 0,96 | 4,81 |
| | | | H | 1,55 | R _s | 0,71 | | |
| | | | Σ | 2,79 | Σ | 1,06 | | |
| | Promedio | 3,5 ; 3,7 | 4,52 ; 3,94 | | 2,46 ; 1,99 | | 2,88 ; 2,2 | 9,86 ; 8,13 |
| | Desviación | 0,7 ; 0,6 | 0,1 ; 1,00 | | 0,09 ; 0,81 | | 0,51 ; 1,2 | 0,32 ; 2,92 |
| PROMEDIO TOTAL | | 2,5 ; 2,67 | 4,14 ; 3,85 | | 2,02 ; 1,81 | | 2,53 ; 2,2 | 8,69 ; 7,85 |
| DESVIACIÓN TOTAL | | 0,9 ; 0,97 | 0,87 ; 0,66 | | 0,54 ; 0,33 | | 0,94 ; 0,09 | 1,75 ; 1,07 |

Donde,

| | | | | | |
|----|-------------|----------------|--------------------|----|------------------|
| PA | Parte aérea | R | Raíces | Rz | Rizoma |
| T | Tallos | R _p | Raíces primarias | * | Brote remplazado |
| H | Hojas | R _s | Raíces secundarias | | |

Relación parte aérea – raíz promedio de MxG con tratamiento ETM:

| | Modalidad 10100 | Modalidad 10110 | Modalidad 10101 | TRATAMIENTO |
|----------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------|
| PA / R | 2,17 | 2,22 | 1,84 | 2,08 |
| PA / R * | 2,21 | | 1,98 | 2,14 |

Anexo G. Registros de la evolución del crecimiento de *Miscanthus x giganteus* – Suelo de la mina Carreau Wendel

- Seguimiento a la altura de MxG:

| | Modalidad | | | | | | | | |
|----------|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 100 | | 110 | | 101 | | | | |
| | Ind 1 | Ind 2 | Ind 1 | Ind 2 | Ind 1 | Ind 2 | Ind 3 | Ind 4 | Ind 5 |
| 13-jul. | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 21-jul. | 0,0 | 0,0 | 2,5 | 1,0 | 1,0 | 3,0 | 3,5 | 0,0 | 0,0 |
| 24-jul. | 0,0 | 0,0 | 8,8 | 6,5 | 4,7 | 10,5 | 12,5 | 2,5 | 0,0 |
| 27-jul. | 2,0 | 0,0 | 9,5 | 9,5 | 7,5 | 14,0 | 15,5 | 4,5 | 0,0 |
| 4-août | 17,0 | 8,0 | 24,3 | 17,5 | 12,0 | 31,5 | 37,5 | 9,0 | 7,5 |
| 11-août | 21,5 | 14,7 | 32,5 | 26,5 | 13,5 | 37,5 | 47,7 | 12,0 | 18,3 |
| 17-août | 23,5 | 15,0 | 36,5 | 31,0 | 14,5 | 38,0 | 47,7 | 14,3 | 19,0 |
| 21-août | 25,5 | 19,0 | 40,0 | 36,5 | 17,0 | 41,0 | 55,5 | 15,0 | 23,5 |
| 25-août | 25,5 | 20,0 | 42,5 | 42,5 | 16,5 | 42,7 | 59,5 | 16,0 | 24,0 |
| 1-sept. | 29,5 | 21,5 | 45,5 | 50,0 | 18,0 | 45,0 | 64,0 | 18,5 | 27,0 |
| 8-sept. | 33,0 | 27,0 | 58,5 | 52,5 | 31,0 | 52,0 | 68,0 | 25,5 | 35,0 |
| 15-sept. | 38,5 | 33,5 | 76,0 | 58,0 | 50,0 | 54,5 | 82,5 | 36,0 | 44,3 |
| 22-sept. | 41,5 | 35,5 | 79,0 | 60,0 | 58,0 | 57,7 | 89,5 | 37,0 | 45,7 |
| 29-sept. | 47,0 | 46,0 | 85,5 | 61,5 | 68,5 | 71,0 | 96,0 | 40,6 | 50,0 |
| 8-oct. | 47,5 | 48,0 | 86,3 | 62,0 | 69,0 | 72,0 | 96,0 | 40,6 | 50,0 |
| 15-oct. | 47,0 | 49,8 | 86,3 | 62,0 | 69,0 | 72,5 | 96,0 | 44,0 | 57,0 |
| 26-oct. | 46,5 | 49,9 | 85,0 | 61,4 | 68,5 | 72,4 | 95,5 | 43,4 | 57,0 |

- Altura promedio de MxG sin tratamiento:

| | Modalidad 100 | Modalidad 110 | Modalidad 101 | TRATAMIENTO |
|----------|------------------|------------------|------------------|-------------|
| Promedio | 48,2 | 73,2 | 67,4 | 62,9 |

100: MxG sola; 110: MxG y Bct; 101: MxG y Cost